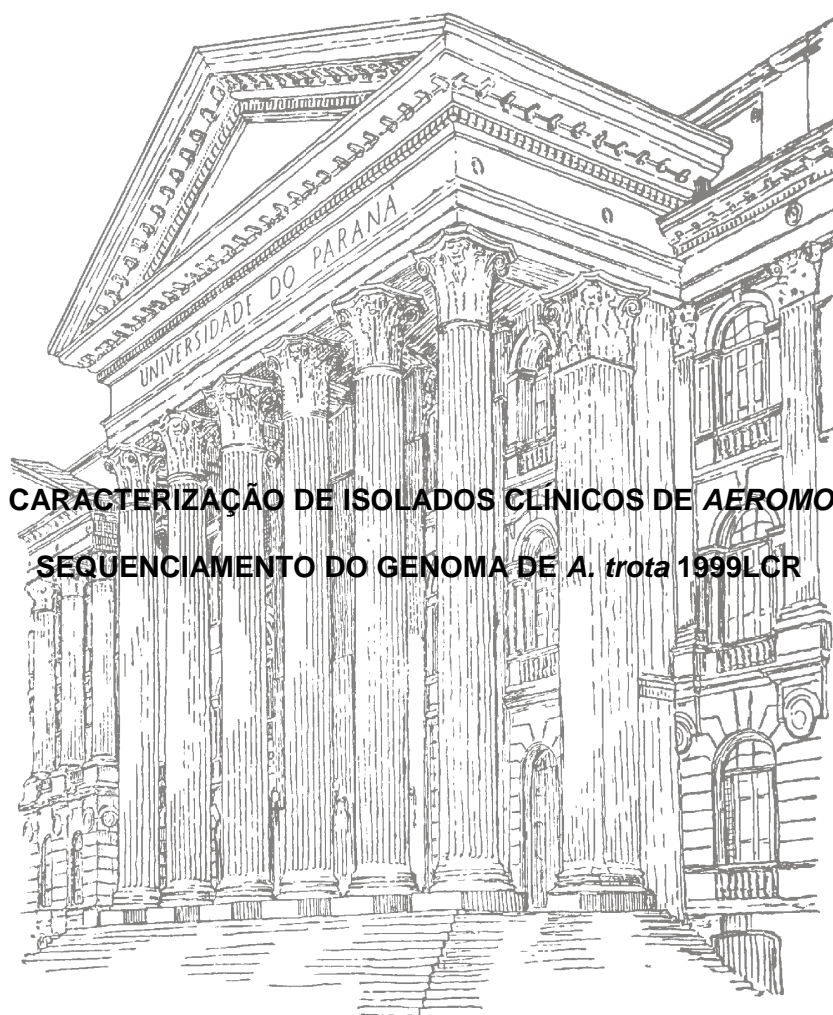


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CIBELLE DE BORBA DALLAGASSA



**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS CLÍNICOS DE AEROMONAS E
SEQUENCIAMENTO DO GENOMA DE *A. trota* 1999LCR**

CURITIBA

2016

CIBELLE DE BORBA DALLAGASSA

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *AEROMONAS* E
SEQUENCIAMENTO DO GENOMA DE *A. trota* 1999LCR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Cyntia M. T. Fadel-Picheth
Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Leda Chubatsu

CURITIBA

2016

Dallagassa, Cibelle de Borba
Caracterização de isolados clínicos de *Aeromonas* e sequenciamento do genoma de A. trota 1999LCR / Cibelle de Borba Dalagassa – Curitiba, 2017.
78 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Cyntia M. T. Fadel-Picheth
Coorientadora: Professora Dra. Leda Chubatsu
Tese (doutorado) – Programa de Pós Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. *Aeromonas*. 2. Genoma. 3. Biologia molecular. I. Fadel-Picheth, Cyntia M. T.
II. Chubatsu, Leda. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 616.014

TERMO DE APROVAÇÃO

CIBELLE DE BORBA DALLAGASSA

Título: "Caracterização de isolados clínicos de *Aeromonas* e sequenciamento do genoma de *A. trota* 1999LCR"

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.


Prof.^a Dr.^a Cynthia Maria Telles Fadel Picheth
Orientadora


Prof.^a Dr.^a Leonardo Magalhães Cruz
Universidade Federal do Paraná


Prof.^a Dr.^a Dayane Alberton
Universidade Federal do Paraná


Prof.^a Dr.^a Marcelo Müller dos Santos
Universidade Federal do Paraná


Prof.^a Dr.^a Maria-Isabel Stets
Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP)

Curitiba, 30 de novembro de 2016.

AGRADECIMENTOS

“Diante da vastidão do tempo e da imensidão do espaço é uma alegria para mim compartilhar uma época e um planeta com você” Carl Sagan. Começo meus singelos agradecimentos com essa frase. Muitas pessoas fizeram parte dessa tese, e tenho certeza que sem a contribuição de cada uma delas esse trabalho não seria possível.

Gostaria de agradecer ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelo apoio durante o desenvolvimento desse trabalho.

Muito obrigada ao Departamento de Bioquímica da UFPR, agradeço o apoio técnico, estrutural e científico, em especial ao super Valter Baura, e aos Professores Leda, Emanuel, Leonardo e Berenice pela oportunidade, confiança, paciência e por todos os ensinamentos que permitiram a construção deste trabalho. Agradeço ao Drº Vinicius Weiss e ao Jean Machado por toda ajuda, sugestões e paciência.

A minha segunda família do laboratório de bacteriologia clínica, companheiras de bancada, de alegrias e frustrações experimentais. Muito obrigada por todo apoio, ajuda, companheirismo, incentivo e descontração. Não poderia ter tido melhores amigas nessa jornada. A Priscila Crete, muito obrigada por todo incentivo, comidinhas e bom humor sempre, a Flávia Assis eu agradeço a ajuda com o PFGE, e por tudo que compartilhamos e evoluímos juntas, sem você não seria possível. A minha querida amiga Karoline Prediger, muito obrigada por ser sempre meu braço direito durante os inúmeros experimentos que fizemos e por toda amizade. Karol, você foi essencial para o desenvolvimento desse trabalho e um grande presente para mim. Obrigada as alunas que depositaram sua confiança em mim durante todo tempo que estive no lab, Marina Sobral, Fabrine e Isabel Robazza. Obrigada a amizade Camila Vandresen e por todo carinho sempre. Agradeço a Monica Surek e Barbara Moriel pelo apoio técnico durante a realização desse trabalho.

Agradeço ao Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN) E Laboratório Municipal de Curitiba, pelas amostras cedidas, e em especial a Sônia Farah e a Carlos Reu. Muito obrigada Profº Bruno Vizzotto pelas estirpes enviadas do Rio Grande do Sul e por toda colaboração sempre. Saudades Bruno.

Aos professores do Departamento de Análises Clínicas, agradeço por todo apoio técnico e estrutural, tempo e sugestões. Em especial ao laboratório de Bioquímica Clínica e ao Profº Geraldo Picheth, Profº Fabiane Rego e Profº Dayane Alberton.

A minha orientadora Profº Cyntia, eu sinceramente não tenho palavras para agradecer. Gostaria apenas de registrar que eu não poderia ter uma Mestre melhor, um grande exemplo de Pessoa e Profissional, e que eu nunca vou conseguir retribuir tudo que recebi. Sou infinitamente grata por tudo que construímos e compartilhamos.

Ao meu marido Thiago, eu agradeço por todo incentivo desde a época da graduação. Muito obrigada por estar sempre presente e por compartilhar minhas aflições e vitórias. Sem seu amor e apoio eu não teria conseguido. Você é uma parte fundamental para esse trabalho.

À minha família agradeço por toda educação que recebi e pelo que sou. Agradeço imensamente pela oportunidade de estudar Farmácia. Obrigada por todo apoio, incentivo e compreensão durante toda minha vida.

Obrigada aos meus amigos que estiveram comigo durante essa jornada, em especial ao Guilherme Picheth, Emanuel Perry e Cintia Olicheves. Muito obrigada por nos receberem como família, sem vocês eu não teria conseguido.

*“Jamais considere seus estudos como uma
obrigação, mas como uma oportunidade
invejável para aprender a conhecer a
influência libertadora da beleza do reino do
espírito, para seu próprio prazer pessoal e
para proveito da comunidade à qual seu
futuro trabalho pertencer. ”*

Albert Einstein

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE ESTIRPES DE <i>Aeromonas</i>	44
FIGURA 2: MOTILIDADE DO TIPO <i>SWIMMING</i> E <i>SWARMING</i>	47
FIGURA 3: RESULTADOS DOS ENSAIOS FENOTÍPICOS DE MOTILIDADE DO TIPO <i>SWIMMING</i> E <i>SWARMING</i>	47
FIGURA 4: HABILIDADE DAS ESPÉCIES DE <i>Aeromonas</i> EM EXPRESSAR MOTILIDADE TIPO <i>SWARMING</i>	48
FIGURA 5: PADRÕES IRREGULARES DE <i>SWARMING</i>	49
FIGURA 6: ANÁLISE COMPARATIVA DE GENOMAS DE <i>AEROMONAS</i>	52
FIGURA 7: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA LOCALIZAÇÃO DAS ILHAS GENÔMICAS PREVISTAS EM <i>A. trota</i> 1999LCR	55
FIGURA 8: DISTRIBUIÇÃO DOS GENES NO <i>CLUSTER</i> SST6 DE <i>A.hydrophila</i> ATCC 7966 E <i>A.trota</i> 1999LCR.....	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. ISOLADOS DE <i>Aeromonas</i> ANALISADOS	26
TABELA 2. SEQUÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES.....	28
TABELA 3. COMPARAÇÃO ENTRE A IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE <i>Aeromonas</i>	37
TABELA 4: ENSAIOS DE BIOFILME UTILIZADOS PARA DEFINIR OS CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO.....	49
TABELA 5: SWARMING E FORMAÇÃO DE BIOFILME EM <i>Aeromonas</i>	50
TABELA 6: RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO NOS EQUIPAMENTOS 454 GS JR E ILLUMINA	51
TABELA 7: CÁLCULO DA DISTÂNCIA INTERGENÔMICA ENTRE O GENOMA DE <i>A.trota</i> 1999LCR E AS ESPÉCIES DE <i>Aeromonas</i> DEPOSITADAS NO NCBI.....	54
TABELA 8: ILHAS GENÔMICAS PREVISTAS EM <i>A. trota</i> 1999LCR	55
TABELA 9: GENES ANOTADOS PELO RAST EM SUBSISTEMAS	57
TABELA 10: FATORES ASSOCIADOS COM VIRULÊNCIA EM <i>Aeromonas</i> PROCURADOS EM <i>A.trota</i> 1999LCR ATRAVÉS DO SOFTWARE BLASTP..	60

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 HISTÓRICO.....	14
2.2 CARACTERÍSTICAS	15
2.3 HABITAT E FONTES DE TRANSMISSÃO	15
2.4 INFECÇÕES ASSOCIADAS COM <i>Aeromonas</i>	16
2.5 FATORES DE VIRULÊNCIA.....	18
2.6 IDENTIFICAÇÃO LABORATORIAL	20
2.7 MÉTODOS MOLECULARES	21
3 JUSTIFICATIVA.....	24
4 OBJETIVOS.....	25
4.1 OBJETIVO GERAL	25
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
5 MATERIAIS E MÉTODOS	26
5.1 AMOSTRA.....	26
5.2 SEQUENCIAMENTO DE <i>gyrB</i>	27
5.2.1 Condições de cultivo	27
5.2.2 Extração de DNA	27
5.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	28
5.2.4 Detecção dos produtos de PCR	28
5.2.5 Reação de Sequenciamento	29
5.3 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE EM CAMPO PULSADO (PFGE)	30
5.3.1 Condições de cultivo	30
5.3.2 Preparo dos blocos	30
5.3.3 Lise das Células Bacterianas	30
5.3.4 Restrição do DNA	31
5.3.5 Eletroforese em Campo Pulsado	31
5.3.6 Análise dos Perfis	31
5.4 SEQUENCIAMENTO DO DNA GENÔMICO.....	32
5.4.1 Condições de cultivo	32
5.4.2 Isolamento do DNA genômico.....	32
5.4.3 Sequenciamento de DNA genômico de <i>A. trota</i> 1999LCR	32
5.4.4 Montagem e Anotação do Genoma.....	33
5.4.5 Detecção de Ilhas Genômicas	33
5.4.6 <i>Average Nucleotide Identity</i> – ANI.....	34
5.4.7 Genome-to-Genome Distance Calculator – GGDC	34
5.5 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME	34
5.6 MOTILIDADE <i>SWIMMING</i> E <i>SWARMING</i>	35
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6.1 SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>gyrB</i>	36
6.2 ELETROFORESE DE CAMPO PULSADO (PFGE)	42
6.3 ENSAIOS DE MOTILIDADE E FORMAÇÃO DE BIOFILME	46
6.4 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO	51
6.4.1 <i>Average Nucleotide Identity</i> (ANI) e Genome-to-genome Distance Calculator (DDH)	53
6.4.2 Detecção de Ilhas Genômicas	54
6.4.3 Anotação automática	56
6.5 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS	58
6.6 VIRULÊNCIA	59
7 CONCLUSÕES.....	65
8 REFERÊNCIAS	66

RESUMO

Aeromonas são bacilos gram-negativos capazes de causar infecções em humanos que variam de diarreia a septicemia e raramente meningite. As espécies mais frequentemente associadas com infecções são *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* sobria, enquanto *A. trota* é raramente isolada de amostras clínicas e ainda é pouco estudada. A identificação dessas bactérias ao nível de espécie é difícil e requer a utilização de métodos moleculares para confirmação. O objetivo desse trabalho foi caracterizar isolados clínicos de *Aeromonas* previamente identificados através de testes microbiológicos e realizar o sequenciamento e anotação do genoma da estirpe *A. trota* 1999LCR. Oitenta e cinco *Aeromonas* foram analisadas através do sequenciamento de *gyrB* o que permitiu identificar as seguintes espécies: *A. caviae* (33), *A. hydrophila* (24), *A. veronii* bv sobria (22), *A. media* (4), *A. aquariorum* e *A. trota* 1 estirpe cada. A espécie *A. media* só foi identificada através do sequenciamento de *gyrB*. A concordância dos resultados da identificação convencional e molecular foi de 83,5%. Setenta e nove perfis de eletroforese em campo pulsado distintos foram observados entre 90 *Aeromonas* analisadas indicando elevada diversidade genética entre elas. Apenas 3 *clusters*, formados respectivamente por *A. caviae* (2 estirpes), *A. veronii* sobria (5 estirpes) e *A. hydrophila* (7 estirpes), foram identificados. Em relação às características fenotípicas 90 estirpes (100%) apresentaram motilidade tipo *swimming*, 51 (57%) motilidade tipo *swarming* e 63 (70%) a capacidade de formar biofilme. Estes resultados indicam que as bactérias analisadas expressam características associadas com adesão, etapa importante no processo de colonização. O sequenciamento da estirpe *A. trota* 1999LCR foi realizado utilizando os sequenciadores 454 GS Junior e Illumina Miseq, a montagem do genoma foi realizada com o software SPADES v.3.5.0 e a anotação automática com o programa *Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology* (RAST) versão 4.0. O tamanho do genoma foi estimado em 4.33Mb alocados em 18 *contigs*, e conteúdo de C+G de 60%. A anotação automática do genoma identificou 3877 sequências codificadoras, 128 tRNAs e 4 operons de rRNA. Utilizando o RAST e a busca manual com BLASTP para determinantes de virulência já descritos em outras espécies de *Aeromonas* diversos genes associados com virulência foram identificados no genoma da estirpe 1999LCR. Destaca-se a presença de genes que codificam os flagelos polar e lateral, em concordância com os resultados de *swimming* e *swarming* desta bactéria; toxinas incluindo AerA (aerolisina), hemolisina III, hemolisina termoestável e hemolisina *cupin-like*, que podem estar associadas com a atividade hemolítica, previamente descrita, da bactéria contra eritrócitos humanos. Genes que codificam um Sistema de Secreção Tipo 6 (SST6), associado com atividades citotóxicas, apoptose e escape da fagocitose em outras espécies de *Aeromonas*, também foram identificados. Outras características associadas com virulência identificadas incluem adesinas, enterotoxina citotônica Alt, várias enzimas previamente associadas com invasão de tecidos do hospedeiro e um inibidor da lisozima da família Ivy que poderia proteger a bactéria da atividade lítica da enzima. Portanto, diversos genes que podem participar na patogênese da bactéria, foram identificados no genoma de *A. trota* 1999LCR.

ABSTRACT

Aeromonas are gram-negative bacilli capable of causing infections in humans ranging from diarrhea to septicemia and rarely meningitis. The species most frequently associated with infections are *A. hydrophila*, *A. caviae* and *A. veronii* sobria, while *A. trota* is rarely isolated from clinical samples and is still poorly studied. The identification of these bacteria at the species level is difficult and requires the use of molecular methods for confirmation. The objective of this work was to characterize clinical isolates of *Aeromonas* previously identified through microbiological tests and to carry out the sequencing and annotation of the genome of *A. trota* strain 1999LCR. Eighty-five *Aeromonas* were analyzed by *gyrB* sequencing which allowed the identification of the following species: *A. caviae* (33), *A. hydrophila* (24), *A. veronii* bv sobria (22), *A. media* (4), *A. aquariorum* and *A. trota* 1 strain each. The *A. media* species was identified only through the *gyrB* sequencing. The agreement between results of the conventional and molecular identification was 83.5%. Seventy-nine distinct pulsed field electrophoresis profiles were observed among the 90 *Aeromonas* analyzed indicating high genetic diversity between them. Only 3 clusters, formed by *A. caviae* (2 strains), *A. veronii* bv sobria (5 strains) and *A. hydrophila* (7 strains) were identified. In relation to the phenotypic characteristics, 90 strains (100%) exhibited the swimming motility, 51 (57%) the swarming motility, and 63 (70%) the ability to form biofilm. These results indicate that these bacteria are able to express characteristics associated with adhesion, an important step in the colonization process. Sequencing of the *A. trota* strain 1999LCR was performed using the 454 GS Junior and Illumina Miseq sequencers; assembly of the genome was performed with SPADES software v.3.5.0 and automatic annotation with *Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology* (RAST) version 4.0. The genome size was estimated in 4.33 Mb allocated in 18 contigs with C + G content of 60%. The genome automatic annotation identified 3877 coding sequences, 128 tRNAs and 4 rRNA operons in *A. trota* 1999LCR. Using RAST and the manual search with BLASTP for virulence determinants already described in other species of *Aeromonas* several genes associated with virulence were identified in the genome of strain 1999LCR. Among them are genes encoding the polar and lateral flagella, what is in agreement with the results of swimming and swarming motility of this bacterium; toxins including AerA (aerolysin), hemolysin III, thermostable hemolysin and cupin-like hemolysin, which may be associated with the previously described hemolytic activity of the bacterium against human erythrocytes. Genes encoding a Type 6 Secretion System (SST6), associated with cytotoxic activities, apoptosis and escape of phagocytosis in other *Aeromonas* species, have also been identified. Other virulence-associated traits identified include adhesins, the cytotoxic enterotoxin Alt, various enzymes previously associated with invasion of host tissues, and an inhibitor of lysozyme from the Ivy family that could protect the bacteria from lytic activity of that enzyme. Therefore, several genes that may participate in the pathogenesis of the bacterium were identified in the genome of *A. trota* 1999LCR.

1 INTRODUÇÃO

Aeromonas são bacilos gram negativos, anaeróbios facultativos, citocromo oxidase-positiva que fermentam glicose e não esporulam. Reduzem nitrato, mas não desnitrificam. Podem ser classificadas em psicrófilas e mesófilas de acordo com a temperatura ótima de crescimento. As espécies mesófilas geralmente são móveis apresentando flagelo polar e parte delas pode expressar também flagelos laterais (MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005; JANDA e ABBOT, 2010).

Aeromonas são ubíquas do ambiente aquático e são comumente encontradas em reservatórios de água doce como lagos, rios, reservatórios de água potável, águas subterrâneas, águas residuais e de esgoto, além de águas salgadas com baixa concentração de sal (HORNEMAN, ALI e ABBOTT, 2007). Também podem ser recuperadas a partir de água potável que atende os padrões de qualidade para organismos indicadores (PABLOS *et al.*, 2009) e alimentos, o que sugere que uma rota para contaminação humana ocorre pela via oral (GALINDO *et al.*, 2006).

Algumas espécies de *Aeromonas* são capazes de causar uma variedade de infecções em humanos, incluindo doenças intestinais e extra-intestinais como infecções de feridas, dos tecidos subcutâneos, fasciíte necrotizante, septicemia, infecções do trato respiratório, ocular e urogenital, meningite, e também podem afetar ossos e articulações. As gastroenterites são as doenças mais comumente causadas por estes patógenos e podem ser do tipo aquosa e autolimitada até casos mais graves com presença de sangue e muco nas fezes. *Aeromonas* também são uma causa de diarreia do viajante (GALINDO *et al.*, 2006; JANDA e ABBOT, 2010).

As espécies mais frequentemente associadas com infecções em humanos são *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* bv sobria. *A. trota* é uma espécie raramente associada com infecção em humanos (JANDA e ABBOT, 2010) e ainda é pouco estudada (GRIM *et al.*, 2014).

Aeromonas podem produzir uma vasta gama de fatores de virulência tais como adesinas, cápsula, flagelos polar e lateral, proteases, hemolisinas, citotoxinas, enterotoxinas, leucocidina, elastase, entre outros (CHOPRA 1999; JOSEPH e CARNAHAN, 2000; GALINDO *et al.*, 2006; GRIM *et al.*, 2013, 2014).

Apesar da grande importância em termos de saúde pública, *Aeromonas* não são pesquisadas rotineiramente no laboratório clínico o que dificulta a obtenção de dados epidemiológicos no país. O número crescente de espécies reconhecidas representa uma dificuldade para a identificação desses organismos no laboratório clínico (ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003; JANDA e ABBOTT, 2010). Embora testes

para a identificação de *Aeromonas* já tenham sido estabelecidos (ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003), podem não ser adequados para a diferenciação das novas espécies; outro fator complicador é a falta de padronização, e a utilização de testes inadequados para a identificação de bactérias desse gênero pode levar à identificação errônea como *Escherichia coli*, *Plesiomonas shigelloides* e *Vibrio* spp. que compartilham algumas características fenotípicas com *Aeromonas* (ABBOTT *et al.*, 1998).

Uma alternativa para a identificação de *Aeromonas* ao nível de espécie é a utilização de métodos moleculares como análise de Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição (RFLP) de 16S rDNA e/ou sequenciamento de genes essenciais (BORRELL *et al.* 1997, YAÑEZ *et al.*, 2003; SOLER *et al.*, 2004).

Dessa maneira, considerando a importância de *Aeromonas* como patógenos, a dificuldade para a sua identificação, e que estas bactérias ainda são pouco estudadas em nosso meio, este trabalho visa contribuir para o conhecimento desses micro-organismos através da caracterização molecular de isolados clínicos e determinar a expressão de fatores associados com virulência como a motilidade e capacidade de formação de biofilme. Adicionalmente, foi realizado o sequenciamento do genoma de *A. trota* 1999LCR o que contribuirá para a compreensão das características associadas com essa espécie ainda pouco estudada.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

A evidência mais antiga documentada sobre a existência de *Aeromonas* data de 1891, quando este micro-organismo foi isolado a partir do sangue e da linfa de um sapo infectado, recebendo a denominação de *Bacillus hydrophilus fuscus*. A partir de então inúmeros relatos de sua presença ocorreram até a sua reclassificação como *Bacteria hydrophila* em 1901. Devido à falta de consenso sobre o nome, muitos pesquisadores classificaram-na em diferentes gêneros, como *Aerobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Achromobacter*, *Flavobacterium* e *Vibrio*. Apenas em 1936 foi proposto o nome *Aeromonas* para este micro-organismo (PERCIVAL *et al.*, 2004). *Aeromonas* foram inicialmente incluídas na família *Vibrionaceae*, no entanto análises de hibridização de DNA-DNA mostraram que esse gênero era diferente dos outros membros do grupo. Análises posteriores realizadas por Colwell e colaboradores (1986) utilizando 16S rRNA e hibridização DNA-rRNA mostraram divergência evolutiva de *Aeromonas* em relação às famílias *Enterobacteriaceae* e *Vibrionaceae*, justificando assim a classificação do gênero *Aeromonas* em sua própria família, *Aeromonadaceae* (BRENNER *et al.*, 2005).

Desde a criação do gênero *Aeromonas* em 1943, até meados dos anos 1970 eram considerados 2 grupos dessas bactérias: as que cresciam entre 35-37°C (mesofílicas) e causavam infecções em humanos, referidas como *A. hydrophila*, e as que cresciam melhor entre 22-28°C (psicrofílicas) e causavam primariamente infecções em peixes, designadas como *A. salmonicida*. Estes grupos eram fenotipicamente bem distintos e podiam ser distinguidos com base em algumas propriedades incluindo, além da temperatura ótima de crescimento, motilidade, produção de indol e produção de um pigmento em ágar tirosina (JANDA e ABBOTT, 1998). O número de espécies mesofílicas expandiu e foram reconhecidas as espécies *A. caviae*, *A. media* e *A. sobria*.

Desde 1987 várias novas espécies foram propostas e até 2010 eram reconhecidas 21 espécies no gênero *Aeromonas* (JANDA e ABBOTT, 2010). Destas, pelo menos 11 foram associadas com infecções em humanos, sendo que *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* biovar *sobria* são responsáveis por cerca de 85% dos isolados de infecções humanas (JANDA e ABBOTT, 2010) e consideradas as de maior relevância clínica (VILA *et al.*, 2003; GUERRA *et al.*, 2007; DWIVEDI *et al.*, 2008). Recentemente, *A. aquariorum* e *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* foram reclassificadas como *Aeromonas dhakensis* (BEAZ-HIDALGO *et al.*, 2013). Os métodos de análises

de sequências genômicas confirmam que *A. dhakensis* é uma nova espécie e que muitos desses isolados foram erroneamente identificados como *A. hydrophila* (COLSTON et al., 2014; BEAZ-HIDALGO et al., 2015).

2.2 CARACTERÍSTICAS

Aeromonas spp. são bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos, fermentam a glicose e são citocromo oxidase, catalase e indol positivos. São capazes de fermentar maltose, D-galactose e trealose. *Aeromonas* móveis são negativas para a produção de urease, pectinase, ornitina descarboxilase, triptofano e fenilalanina desaminase. São incapazes de fermentar xilose, sorbose, eritritol, adonitol, dulcitol e de produzir H₂S em ágar Kliger Ferro (PARKER e SHAW, 2010). Podem produzir diversas enzimas como amilases, β -lactamases, proteases, lipases, nucleases entre outras, o que contribui significativamente para a distribuição dessas bactérias e sua capacidade de adaptação em diferentes ambientes (PEMBERTON et al., 1997).

2.3 HABITAT E FONTES DE TRANSMISSÃO

Aeromonas são encontradas praticamente em todos os ambientes, mas principalmente em ambientes aquáticos como rios, lagos, lagoas de água salgada, água potável, subterrânea, e no esgoto (HORNEMAN, ALI e ABBOTT, 2007).

O isolamento de *Aeromonas* a partir de diversos alimentos tais como vegetais, leite e produtos lácteos, carne, aves, mariscos, peixes (BORREL et al., 1998; NEYTS et al., 2000; MCMAHON & WILSON, 2001), ostras (EVANGELISTA-BARRETO et al., 2006), sugere que a colonização do trato gastrointestinal humano seja efeito decorrente do consumo de água e alimentos contaminados, uma vez que essas bactérias não pertencem a microbiota intestinal normal (JANDA e ABBOTT, 2010). Desde 1984 *Aeromonas* têm sido consideradas como potenciais agentes de infecções alimentares (BUCHANAN, 1984).

O isolamento de *A. hydrophila* a partir de alimentos e água e a resistência deste organismo a antibióticos e à cloração da água representa uma ameaça à saúde pública (GALINDO et al., 2006). *Aeromonas* são citadas na lista do *Food and Drug Administration* como patógenos presentes em alimentos (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2004) e devem ser consideradas como patógenos emergentes (MERINO et al., 1995).

Aeromonas são também frequentemente recuperadas de vertebrados e outros hospedeiros podendo causar uma grande variedade de doenças, tanto em animais de sangue frio quanto de sangue quente (BRENNER *et al.*, 2005).

Foram descritos vários casos de infecção por *Aeromonas* spp. após o contato direto de feridas com água contaminada, causando ulcerações purulentas ou fasciite necrotizante, algumas vezes, evoluindo para sepse (GOLD e SALIT, 1993; MONAGHAN *et al.*, 2008; GRIM 2014). A transmissão direta pessoa-pessoa, embora rara, já foi relatada (MOYER e LAREW, 1988; TORRE *et al.*, 1996), bem como a transmissão através do uso terapêutico de sanguessugas contaminadas (BRASCHLER *et al.*, 2003). Também já foram descritos alguns casos de infecção por *A. hydrophila* após ataque de animais selvagens como ursos e serpentes (ANGEL *et al.*, 2002; JORGE *et al.*, 1998; KUNIMOTO *et al.*, 2004).

Eventos traumáticos como acidentes, ataques de animais e introdução de corpos estranhos contendo *Aeromonas* ou até mesmo lacerações que entrem em contato com ambientes contaminados podem gerar infecções por estes agentes (KHARDORI, FAINSTEIN, 1988; JANDA e ABBOTT, 2010; PARKER e SHAW, 2010).

2.4 INFECÇÕES ASSOCIADAS COM *Aeromonas*

Aeromonas mesófilas são patógenos emergentes e importante causa de infecções em humanos, capazes de causar infecções intestinais, extra-intestinais e infecções sistêmicas (TÓMAS, 2012). Aproximadamente 85% dos isolados clínicos são *A. hydrophila*, *A. caviae*, e *A. veronii* biovariedade (bv) sobria (JANDA e ABBOTT, 2010; TÓMAS, 2012). *A. trota* é uma causa pouco comum de infecção em humanos e tem sido associada com gastroenterite (REINA *et al.*, 1996; SINHA *et al.*, 2004), infecções de pele e choque séptico (LAI *et al.*, 2007).

Gastroenterite é o principal problema de saúde associado com *Aeromonas*, tanto em países industrializados como em nações em desenvolvimento, e abrange todos os grupos etários. Afeta pessoas imunodeprimidas e indivíduos saudáveis. Esse tipo de infecção também tem sido associado com viagens, particularmente para países em desenvolvimento, causando a diarreia do viajante (GALINDO *et al.*, 2006; GASCÓN, 2006). A contaminação com *Aeromonas* ocorre através da ingestão de água e alimentos contaminados com a bactéria (HOLMBERG *et al.*, 1986, KHAJANCHI *et al.*, 2010; JANDA e ABBOTT, 2010).

A gastroenterite causada por *Aeromonas* pode apresentar diferentes quadros clínicos que variam em gravidade. O quadro mais comum é a enterite aquosa. Esta apresentação clínica foi observada em 75% a 89% de todos os casos de gastroenterite,

nos quais *Aeromonas* foi considerada o único agente patogênico. Os principais sintomas que acompanham esta síndrome incluem febre, dor abdominal, e a desidratação é tipicamente leve a moderada. A gastroenterite disenterica é muito menos comum, sendo que os estudos relatam frequências de 3% a 22%. Os sintomas mais comuns incluem cólicas abdominais, sangue e muco nas fezes (CHOPRA e HOUSTON, 1999; VILA *et al.*, 2003).

Os casos de diarreia subaguda podem ser definidos como uma síndrome com duração variando de duas semanas a dois meses, apresentando sintomas inespecíficos com múltiplas evacuações por dia, por vezes acompanhados pela perda de peso significativa ao longo do tempo. Já os casos crônicos, com duração de meses ou até mesmo um ano, podem levar ao desenvolvimento de colite ulcerativa (JANDA e ABBOTT, 2010).

O segundo local anatômico mais comum a partir do qual *Aeromonas* são recuperadas, são os tecidos moles subjacentes à epiderme, e as manifestações clínicas podem variar de quadros leves, como a celulite, a lesões pustulares, ou mesmo fatais (JANDA e ABBOTT, 2010). A fasciíte necrotizante, que pode resultar de traumas, pode levar a doença severa requerendo a amputação de membros ou casos de sepse fulminante. Esta patologia é mais comum em pessoas com doença hepática ou maligna, e apresenta alta taxa de mortalidade (JANDA e ABBOT, 2010).

O quadro mais grave associado à doença invasiva por *Aeromonas* é a septicemia. Em geral *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* bv. sobria são responsáveis por cerca de 95% dos casos de septicemia por *Aeromonas*. Raramente *A. jandaei*, *A. veronii* bv. *veronii* e *A. schubertii* têm sido documentadas como agentes desse tipo de infecção (JANDA e ABBOTT, 2010).

Pessoas imunodeprimidas, com doenças mieloproliferativas, ou com doenças crônicas do fígado, são populações de risco para o desenvolvimento desta forma de infecção (MENCACCI *et al.*, 2003, TENA *et al.*, 2007). A sintomatologia de sepse por *Aeromonas* em nada difere daquela causada por outros micro-organismos. Os sintomas mais comuns incluem febre (74% a 89% dos afetados), icterícia (57%), dor abdominal (16% a 45%), choque séptico (40% a 45%) e dispnéia (12% a 24%). A diarreia pode ser anterior ou concomitante com o aparecimento de bacteremia, ocorrendo em uma porcentagem muito pequena dos casos (JANDA e ABBOT, 2010). O contato com habitats de água doce ou profissão associada a estes ambientes, como pesca, além de episódios traumáticos, como acidentes e picadas de cobra, anteriores ao quadro séptico, podem sugerir infecção por *Aeromonas* (JANDA e ABBOTT, 2010).

Existem poucos relatos na literatura a respeito de meningite causada por *Aeromonas*, a maioria dos casos foi associado com *A. hydrophila* (PAMPÍN et al., 2012; den BUTTER, 2013; KUMAR, 2014; SALUNKE, 2015).

Aeromonas são capazes de causar infecções intra-abdominais, como pancreatite, colangite aguda e abscesso hepático e peritonite, geralmente em pessoas de meia-idade com doenças subjacentes. Também podem causar infecção do trato respiratório como pneumonia, empiema e a formação de abscessos pulmonares, além de várias outras doenças incluindo infecções oculares, que variam de endoftalmite a ceratite e ulceração da córnea (JANDA e ABBOTT, 2010), infecções do trato urinário como cistite (AL-BENWAN et al., 2007), e osteomielite (JANDA e ABBOTT, 2010).

2.5 FATORES DE VIRULÊNCIA

Além dos fatores intrínsecos do hospedeiro, como estado nutricional e imunológico, fatores bacterianos, denominados mecanismos ou fatores de virulência, são importantes para o desenvolvimento de infecções.

A virulência das *Aeromonas* é multifatorial e diversos genes associados com a patogênese desses micro-organismos já foram identificados (JANDA, 1991; GRIM et al., 2013, 2014; RASMUSSEN-IVEY, et.al., 2016). Muitas toxinas que podem participar na patogênese de *Aeromonas* têm sido descritas, entre elas diversas hemolisinas, enterotoxinas citotônica e citotóxica, leucocidinas e endotoxina que apresentam atividade tóxica sobre o hospedeiro. As adesinas e pili também desempenham um papel essencial para a fixação da bactéria às células do hospedeiro; a produção de cápsula, que dificulta a fagocitose (CHOPRA e HOUSTON, 1999; GALINDO et al., 2006) e além disso, a produção e secreção de diversas enzimas como a lecitinase, proteases, lipases auxiliam na invasão tecidual (MERINO et al., 1999; GALINDO et al., 2006; JANDA e ABBOTT, 2010; TÓMAS, 2012; RASMUSSEN-IVEY, et al., 2016).

Os sistemas de secreção tipo 2 (SST2), 3 (SST3) e 6 (SST6) também desempenham papel relevante na virulência de *Aeromonas*. O SST2 é amplamente conservado em bactérias gram-negativas principalmente em patógenos de plantas, animais e humanos (MICHEL e VOULHOUX, 2011). Esse sistema participa na secreção extracelular de uma ampla variedade de fatores de virulência (RASMUSSEN-IVEY et al., 2016) incluindo toxinas e fatores de virulência associados a superfície celular, mas também de uma ampla gama de enzimas que hidrolisam macromoléculas como lipídeos, polissacarídeos e proteínas envolvidas em vários processos biológicos como respiração, formação de biofilme, ligação a substrato e fixação bacteriana (RONDELET e CONDEMINE, 2013). A secreção das proteínas pelo SST2 ocorre em

duas etapas no qual estas proteínas são exportadas através da membrana citoplasmática e liberadas no periplasma antes de serem transportadas para o meio externo (MICHEL e VOULHOX, 2009).

Por sua vez o sistema de secreção tipo 3 (SST3) é encontrado em maior frequência em isolados clínicos do que em isolados ambientais (RASMUSSEN-IVEY, et al., 2016). É uma estrutura complexa formada por várias subunidades, dentre as quais 20 proteínas são estruturais e as demais auxiliadoras no processo de secreção e proteínas efetoras (COBURN et al., 2007). O SST3 funciona como uma agulha molecular, injetando proteínas efetoras diretamente do citoplasma bacteriano para o citoplasma da célula hospedeira, assim contribuindo para a virulência de *Aeromonas* (RASMUSSEN-IVEY, et al., 2016).

O sistema de secreção tipo 6 (SST6) é encontrado em muitas bactérias gram-negativas. É uma estrutura complexa que pode exportar proteínas efetoras no meio extracelular e/ou translocá-las diretamente no citoplasma das células eucarióticas hospedeiras (SUAREZ et al., 2008 e 2010). A presença dos sistemas de secreção tipo 3 e 6, enterotoxina citotóxica e enterotoxina A foi associada com estirpes mais virulentas de *Aeromonas* (GRIM et al., 2014).

A motilidade confere uma vantagem para a sobrevivência permitindo que as bactérias respondam a condições ambientais favoráveis ou desfavoráveis, e na competição com outros micro-organismos (MERINO et al., 2006). A motilidade está associada com a expressão de flagelos que são estruturas importantes para a capacidade de a bactéria causar infecção. *Aeromonas* possuem um flagelo polar (POF) de expressão constitutiva e algumas espécies podem apresentar flagelo lateral (LAF) (MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005). Existem 2 tipos de motilidade flagelar: *Swimming*, realizado pelo flagelo polar (MERINO et al., 2006) em bactérias individuais (TÓMAS, 2012) e *Swarming*, associado com o flagelo lateral (MERINO et al., 2006) e em bactérias agrupadas (TÓMAS, 2012). Poucas bactérias podem expressar ambos os sistemas flagelares como *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas* spp., *Azospirillum brasilense*, *Rhodospirillum centenum*, *Helicobacter mustelae* e *Plesiomonas shigelloides* (MERINO et al., 2006).

O flagelo polar em *Aeromonas* é constitutivamente expresso e requer cerca de 50 genes para sua síntese e montagem (LOWRY et al., 2014). O flagelo lateral é induzível e expresso em meios viscosos ou em superfícies (MERINO et al., 2006) e sua expressão é altamente regulada (LOWRY et al., 2014).

O flagelo polar parece ter um importante papel na adesão inicial de bactérias em células do epitélio gastrointestinal, enquanto a função do flagelo lateral pode ser aumentar a adesão celular (KIROV et al., 2003, 2004). Ambos os flagelos estão

associados com a colonização e formação de biofilmes (KIROV et al., 2003, 2004; VILLARI et al., 2003).

Biofilmes são adaptações procarióticas, formados por uma comunidade de micro-organismos organizados, embebidos em substância polimérica extracelular (FLEMMING e WINGENDER, 2010), a fim de promover crescimento, sobrevivência em ambientes hostis e colonizar novos nichos ambientais (HALL-STOODLEY e STOODLEY, 2009), além de conferir resistência a agentes antimicrobianos e às defesas do hospedeiro (RASMUSSEN-IVEY, et.al., 2016). *Aeromonas* são eficientes colonizadores de superfícies e importantes constituintes de biofilmes (SCOARIS et al., 2007), o que pode colaborar para a infectividade da água e encanamentos (PARKER e SHAW, 2010; VILLARI et al., 2003). Clinicamente os biofilmes são importantes e estão associados com infecções como periodontites, infecção crônica do trato urinário, além de infecções ligadas a utilização de dispositivos médicos e por exibirem resistência aos antimicrobianos (HALL-STOODLEY e STOODLEY, 2009).

2.6 IDENTIFICAÇÃO LABORATORIAL

A identificação bacteriana é baseada na realização de exames microscópicos, como a coloração de Gram, no cultivo do micro-organismo e sua caracterização bioquímica com base em critérios fenotípicos (JANNES e VOS, 2006).

Aeromonas não são fastidiosas e crescem em meios de cultura como ágar sangue, ágar MacConkey e vários meios para o isolamento de patógenos entéricos. No entanto, a identificação bioquímica de *Aeromonas* spp. ainda é problemática, e pode resultar na classificação errônea desses microrganismos em outros gêneros (SOLER et al., 2003; JANDA E ABBOTT, 2010) como *Vibrio* e *Plesiomonas*. A última pode ser diferenciada de *Aeromonas* através de resultados positivos nos testes de arginina, lisina e ornitina de Möeller e pela fermentação do m-inositol. A diferenciação dos víbrios é mais difícil, particularmente para *V. fluvialis* e *A. caviae*. A resistência ao agente vibriostático O/129 e a inability de crescer em concentrações de NaCl igual ou superior a 6% geralmente indicam o gênero *Aeromonas*, mas há exceções, e são necessários testes adicionais para diferenciar essas bactérias (ABBOTT, 2003).

Testes específicos são necessários para a identificação de isolados de *Aeromonas* ao nível de espécie (ABBOTT e JANDA, 2003; JANDA e ABBOTT, 2011). Assim, colônias de bacilos gram negativos que produzem resultados positivos no teste de citocromo oxidase devem ser submetidas às provas de fermentação da glicose e crescimento em NaCl com concentrações variando de 0 a 6%, produção de gás a partir da glicose, capacidade de fermentar uma série de carboidratos tais como L-arabinose,

sacarose, D-manitol; fermentação do glicerol; utilização de citrato, hidrólise da gelatina, produção de indol, teste de Voges-Proskauer, resistência à cefalotina e ampicilina e ao agente vibriostático O/129, descarboxilação de lisina, ornitina e arginina, entre outros testes (ABBOTT, CHEUNG, JANDA, 2003).

Mesmo assim, a identificação de *Aeromonas* ao nível de espécie utilizando testes microbiológicos convencionais pode ser difícil devido à falta de uma clara diferenciação fenotípica, ao contínuo número de espécies novas que estão sendo reconhecidas e às pobres descrições quanto às suas características bioquímicas, tornando a taxonomia do gênero complexa e controversa (SAAVEDRA et al., 2006; PABLOS *et al.*, 2009; JANDA e ABBOTT, 2010). Também pode ser difícil separar *A. veronii* de *A. sobria* de *A. hydrophila* utilizando testes bioquímicos convencionais (JANDA e ABBOTT, 2010).

Outros fatores a serem considerados são os esquemas bioquímicos atualmente utilizados, que foram desenvolvidos antes da descrição de novos grupos taxonômicos (ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003; JANDA e ABBOTT, 2010) e a falta de padronização nas condições de realização dos testes o que pode afetar os resultados (ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003).

Poucos laboratórios são capazes de identificar *Aeromonas* além do nível de complexos. Com base nos resultados das reações de lisina e ornitina descarboxilase, arginina dihidrolase, esculina, teste de Voges-Proskauer, L-arabinose e produção de gás a partir de glucose, a maioria dos isolados clínicos de *Aeromonas* pode ser classificada em 3 complexos: complexo *A. hydrophila*, que inclui as espécies *A. hydrophila*, *A. bestiarum* e *A. salmonicida*; complexo *A. caviae*, que contém *A. caviae*, *A. media* e *A. eucrenophila*; ou complexo *A. sobria* que compreende *A. veronii* HG8, *A. jandaei*, *A. schubertii* e *A. trota* (ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003).

Os sistemas comerciais de identificação tais como API 20E e Vitek, dentre outros, apresentam limitações em diferenciar corretamente as espécies de *Aeromonas*, tendendo a classificar grande parte das estirpes como *A. hydrophila* (SOLER et al., 2003; SUREK et al., 2010).

2.7 MÉTODOS MOLECULARES

Os métodos moleculares são amplamente utilizados na microbiologia para a identificação bacteriana definindo gêneros ou espécies, para a tipagem de estirpes, nos estudos filogenéticos e epidemiológicos, na detecção de genes de virulência e resistência aos antimicrobianos (JANNES e DE VOS, 2006).

Técnicas moleculares como o polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (RFLP) do gene 16S rRNA (BORRELL *et al.*, 1997; ALPERI *et al.*, 2008) e o sequenciamento dos genes *gyrB* e *rpoD* (YAÑEZ *et al.*, 2003; SOLER *et al.*, 2004; KÜPFER *et al.*, 2006) podem ser aplicadas para a identificação de *Aeromonas* ao nível de espécie. O sequenciamento dos genes *gyrB* e *rpoD* têm sido amplamente utilizado para fins de identificação e estudos filogenéticos de *Aeromonas* (YAÑEZ *et al.*, 2003; SOLER *et al.*, 2004; KÜPFER *et al.*, 2006; PARKER e SHAW, 2010).

Técnicas moleculares também podem ser utilizadas para a tipagem de bactérias, o que consiste na diferenciação de micro-organismos de uma mesma espécie. Entre as técnicas aplicadas para a tipagem destacam-se a eletroforese em gel de agarose em campo pulsado (PFGE), polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição (PCR-RFLP), *Multi locus sequence typing* (MLST), *REP Repetitive Extragenic Palindromic* (REP), *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC-PCR), *Amplified restriction fragment polymorphism* (AFLP) (REBOLI *et al.*, 1994; LAY JR. e HOLLAND, 2001; BARRETT *et al.*, 2006) entre outras. Dentre essas a PFGE é considerada como o padrão ouro para os estudos epidemiológicos (PERSING *et al.*, 2004; BARRET *et al.*, 2006), devido a ampla aplicabilidade e alto poder discriminatório (BARRET *et al.*, 2006).

A PFGE gera “impressões digitais” do micro-organismo em estudo, o que ocorre após a digestão do DNA cromossômico com enzimas de restrição e a separação eletroforética dos grandes fragmentos gerados através de um campo elétrico com pulsos em diferentes direções em intervalos de tempo determinados (LAY JR. e HOLLAND, 2001; PERSING *et al.*, 2004). Esta metodologia é importante no controle e monitoramento de surtos e também para estudos sobre a genética de população e patogênese bacteriana (JANNES e DE VOS, 2006), e tem sido amplamente aplicada no estudo das bactérias causadoras de infecções humanas e de animais, permitindo identificar os clones associados com surtos de doença.

Há poucos estudos sobre PFGE realizados com *Aeromonas* (HÄNNINEN; HIRVELÄ-KOSKI, 1999; O'HICI *et al.*, 2000; BORCHARDT *et al.*, 2003; VILLARI *et al.*, 2003; KÖRKÖCA *et al.*, 2013) e não há uma metodologia padronizada para esta bactéria o que dificulta a comparação de resultados.

Com o desenvolvimento dos novos métodos de sequenciamento, a análise genômica vem sendo amplamente aplicada ao estudo dos patógenos humanos. A grande vantagem oferecida pelas tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) como são designadas, é a capacidade de produzir um enorme volume de dados de forma mais econômica e rápida (RONAGHI *et al.*, 1998; METZKER, 2010). A combinação única de protocolos específicos distingue uma tecnologia da outra, mas

todas têm em comum a economia de tempo e custos, gerando quantidades de informação muito maiores que as obtidas através do sequenciamento pelo método de Sanger. Estas características são decorrentes do uso da clonagem *in vitro* e de sistemas de suporte sólido para as unidades de sequenciamento, permitindo a realização de milhares de leituras ao mesmo tempo (METZKER, 2010).

O sequenciamento de genomas é uma ferramenta importante para o conhecimento a respeito da composição genética dos microrganismos patogênicos e a percepção sobre como podem ser controlados, sendo que os genomas de patógenos representam aproximadamente 60% de todos os genomas bacterianos sequenciados (GUZMAN *et al.*, 2008). Alguns dos métodos computacionais utilizados para analisar genomas de microrganismos patogênicos podem auxiliar a identificar fatores de virulência e ilhas de patogenicidade, prever proteínas de superfície e as secretadas, vias metabólicas presentes, entre outras características de interesse fornecendo informações básicas para o entendimento da biologia da bactéria e a patogênese da doença causada por ela (GUZMAN *et al.*, 2008).

A rápida disponibilidade de sequências genômicas completas e precisas de patógenos e o aumento das ferramentas de análise disponíveis para a exploração da informação biológica codificada nos genomas são essenciais para a pesquisa e desenvolvimento de vacinas (BAMBINI, RAPPUOLI, 2009; KOSER *et al.*, 2012).

Em 2006 foi anunciada a sequência do primeiro genoma completo de *Aeromonas* (SESHADRI *et al.*, 2006), referente à estirpe *A. hydrophila* ATCC 7966, originalmente isolada a partir de “lata de leite com odor de peixe”. O genoma dessa bactéria compreende um único cromossomo circular de 4.744.448 pares de base (pb), com conteúdo G+C de 61,5%, e 5.195 sequências codificadoras preditas. O genoma contém diversos genes relacionados com a virulência e aptidão metabólica que permitem ao micro-organismo desenvolver-se em uma variedade de ecossistemas, revelando uma bactéria extremamente versátil, com o potencial de deflagrar diferentes processos patogênicos e prontamente persistir no ambiente aquático (SESHADRI *et al.*, 2006). A partir de então pesquisadores têm investido esforços na caracterização genômica de diversas espécies pertencentes ao gênero *Aeromonas*.

Desde então genomas de várias espécies foram sequenciados incluindo *A. salmonicida* (REITH, *et al.*, 2008), *A. caviae* (BEATSON *et al.*, 2011; MORIEL *et al.*, 2015), *A. veronii* (LI, *et al.*, 2011) e *A. aquariorum* (WU *et al.*, 2012) entre outros.

3 JUSTIFICATIVA

Aeromonas podem causar um grande espectro de doenças em humanos que variam em gravidade, desde gastroenterite aguda até mesmo septicemia e raramente meningite (BRENNER *et al.*, 2005; JANDA e ABBOTT, 2010). A ampla distribuição ambiental desses micro-organismos facilita o contato e transmissão aos humanos (JANDA e ABBOTT, 2010).

No Brasil ainda são poucos os dados disponíveis sobre infecções causadas por estes micro-organismos (HOFER *et al.*, 2006, GUERRA *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2008; SUREK *et al.*, 2010; ASSIS, 2014). No Paraná, um estudo desenvolvido por SUREK e colaboradores (2010) encontrou uma prevalência de 2,7% de *Aeromonas* entre pacientes ambulatoriais com diarreia, similar a encontrada para outros enteropatógenos. Em estudo realizado em Curitiba, foi encontrada a frequência de 11,6% de *Aeromonas* em pacientes com diarreia atendidos no Laboratório Municipal de Saúde (ASSIS, 2014).

Embora os dados ainda sejam escassos, já indicam a relevância de *Aeromonas* na saúde pública. Assim sendo, é importante o desenvolvimento de novos estudos visando obter mais informações sobre as características dessas bactérias, visando primeiramente definir a espécie através da utilização de métodos moleculares e verificar a diversidade genética entre os isolados, além de determinar características fenotípicas associadas com virulência, o que permitirá reconhecer grupos de *Aeromonas* com maior circulação na região e seus atributos de virulência.

O sequenciamento do genoma da estirpe de *A. trota* 1999LCR, isolada de líquido cefalorraquidiano de paciente com meningite, contribuirá para desvendar características desta espécie ainda pouco estudada, e o enfoque na identificação de genes potencialmente associados com virulência, através da análise comparativa com genes de virulência já identificados em outras espécies de *Aeromonas* poderá auxiliar na compreensão da sua patogênese.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar estirpes de *Aeromonas* isoladas de infecções humanas no Estado do Paraná e do Rio Grande do Sul e sequenciar e anotar o genoma de *A. trota* 1999LCR.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os isolados clínicos de *Aeromonas* ao nível de espécie utilizando métodos moleculares;
- Padronizar a técnica de PFGE para realizar a tipagem molecular de *Aeromonas*;
- Verificar a expressão de motilidade nas bactérias;
- Determinar a capacidade de formação de biofilme das bactérias;
- Determinar a sequência de nucleotídeos do genoma de *A. trota* 1999LCR e identificar os genes associados com virulência presentes no genoma.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 AMOSTRA

Noventa isolados de *Aeromonas* spp. isoladas nos estados do Paraná e Rio Grande do Sul, previamente caracterizadas através de métodos bioquímicos (VIZZOTTO, 2009; SUREK *et al.*, 2010; PREDIGER, 2012; ASSIS *et al.*, 2014; nossos dados não publicados) foram analisadas quanto ao perfil de PFGE, e fenotipicamente quanto à motilidade e capacidade de formação de biofilme. Dessas estirpes oitenta e cinco também foram analisadas pelo sequenciamento de *gyrB*.

Parte das bactérias também foi previamente analisada em relação a atividade citotóxica e à presença de genes de virulência através de PCR (WOLF, 2011).

Destas bactérias, 17 foram isoladas de secreções de feridas, 1 de líquido céfalo raquidiano e 1 de sangue; as demais foram isoladas de fezes de pessoas com diarreia. As bactérias são mantidas em Cary-Blair sob refrigeração. As bactérias analisadas estão indicadas na TABELA 1.

TABELA 1. INFORMAÇÕES SOBRE OS ISOLADOS DE *Aeromonas* ANALISADOS

IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA	N	ISOLADOS	AMOSTRA CLÍNICA
<i>A. aquariorum</i>	1	L19	Fezes
<i>A. veronii</i> bv sobria	1	L49H	Sangue
	14	L20; L26; L35; L36; L37; L38; L39; L40; L51; L70; MS210; MS312; FA68; BV8	Fezes
<i>A. trota</i>	1	L1999LCR	Líquor
	2	L2; L7	Fezes
<i>A. hydrophila</i>	17	54LM; LM59; LM6; LM7; LM8; LM9; LM1; LM2; LM3; LM11; LM13; LM14; LM15; LM19; LM18; LM4; LM5	Feridas
	7	L4; L44; L63; MS16; MS297; FA93; BV4	Fezes
Complexo <i>A. caviae</i>	4	MS207; MS423; BV3; L49	Fezes

<i>A. caviae</i>	32	L6; L9; L11; L14; L18; L29; L42; L43; L45; L46; L47; L50; L56; L59; L61; L62; L64; L66; L68; L73; L74; MS100; MS10; MS235; MS346; MS547; MS594; MS8; MS92; FA97; LM12; BV11	Fezes
<i>Aeromonas</i> spp.	11	L32; L67; LM16; MS55OB; BV1; BV2; BV5; BV6; BV7; BV9; 17lf	Fezes

Estão destacadas em negrito as bactérias analisadas através do sequenciamento de *gyrB*. Os isolados assinalados com as letras L são originários do LACEN-PR de diversas regiões do Paraná, BV são isolados provenientes de Santa Maria (RGS), LM são isolados de feridas provenientes do Laboratório Municipal de Curitiba e MS são isolados de fezes de pacientes de Curitiba.

FONTE: O autor (2016).

Adicionalmente *A. hydrophila* ATCC 7966 foi utilizada como controle nos ensaios de motilidade do tipo *swimming* e *swarming*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 25922 nos ensaios de formação de biofilme e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Braenderup ATCC BAA-664 como marcador de massa molecular para o ensaio de PFGE.

5.2 SEQUENCIAMENTO DE *gyrB*

Para a identificação molecular de *Aeromonas* a estratégia utilizada foi a amplificação do gene *gyrB* por PCR, e subsequente sequenciamento pela metodologia automatizada de Sanger utilizando ddNTP marcados com fluoróforos.

5.2.1 Condições de cultivo

As bactérias foram cultivadas em ágar MacConkey por 16 a 18 horas, em aerobiose e temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

5.2.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada pela técnica da fervura (OLSVICK e STROCKBINE, 1993).

5.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação de PCR foi realizada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação do gene *gyrB* descritos por YÁÑEZ et al., (2003), cujas seqüências estão indicadas na Tabela 2.

Os iniciadores *gyrB* 3F e *gyrB* 14R permitem amplificar um fragmento de aproximadamente 1110 pb do gene *gyrB* (2412 pb) representando mais de 70% do domínio ATPase e incluindo 191 nucleotídeos da região 3' flanqueadora (YÁÑEZ et al., 2003). Esses iniciadores foram utilizados também para o sequenciamento das extremidades do gene. Os demais iniciadores foram utilizados, quando necessário, para o sequenciamento da região interna do fragmento amplificado.

TABELA 2. SEQUÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

Nome do iniciador	Seqüência 5'→ 3'
<i>gyrB</i> 3F	TCCGGCGGTCTGCACGGCGT
<i>gyrB</i> 9Rs	CCTTGACCGAAATGACCGCC
<i>gyrB</i> 7F	GGGGTCTACTGCTTCACCAA
<i>gyrB</i> 9R	ACCTTGACGGAGATAACGGC
<i>gyrB</i> 14R	TTGTCCGGGTTGTACTCGTC

FONTE: YÁÑEZ et al., 2003.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador Veriti (*Applied Biosystems*), em volume final de 25µL contendo DNA ~20ng, tampão da Taq DNA polimerase (1X), MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 200 µM, 1U de Taq DNA polimerase e 10 pmol dos iniciadores. O seguinte programa foi utilizado para a amplificação: 1 ciclo a 94°C por 4 min e 35 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1min, 72°C por 1 min, seguido de 1 ciclo de 72°C por 5 min.

5.2.4 Detecção dos produtos de PCR

Os produtos das reações de PCR foram detectados através de eletroforese em gel de agarose a 1%. Os géis foram preparados em tampão TBE 1X (TRIS-BORATO-EDTA; SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989), também utilizado para a corrida eletroforética que foi realizada a 35V durante 2 horas. Após a corrida eletroforética, o

gel foi corado em solução de brometo de etídio 0,5µg/ml por 20 minutos, visualizado em transluminador ultravioleta (U.V.) e as imagens registradas utilizando câmera digital.

5.2.5 Reação de Sequenciamento

Para a reação de sequenciamento, 10 µL dos produtos de PCR foram previamente tratados com 3U de Exonuclease I (USB, 3,3 U) e 1U de Fosfatase alcalina (SAP) (USB, 0,66 U) para eliminar os iniciadores e nucleotídeos trifosfatos. Nesta etapa foi utilizado o seguinte programa: 37°C por 45min seguido de 80°C por 15 min. O produto da reação foi utilizado na reação de sequenciamento pelo método de Sanger empregando o kit *BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems)*. A reação de sequenciamento foi realizada em volume final de 10µL contendo aproximadamente 100ng de DNA, 10pmol de um dos iniciadores e 1µL do reagente e do seu respectivo tampão. O programa utilizado foi o seguinte: 30 ciclos a 94°C por 30seg, 55°C por 30seg e 60°C por 30seg.

O produto da reação de sequenciamento foi então tratado com 2µL de acetato de amônio 7,5M e 55µL de etanol absoluto, homogeneizado por inversão e centrifugado por 15 min a 14000 rpm. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado duas vezes com etanol 70%, seco e submetido à eletroforese no Sequenciador Automático de DNA modelo ABI Prism 3500 DNA *Sequencer (Applied Biosystems)* do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR.

Os *softwares* Phred/Phrap/Consed são um pacote de programas que utilizam arquivos de sequenciamento de DNA (eletroforetograma) para realizar a montagem das sequencias. As sequencias geradas foram analisadas com o programa Phred (EWING *et al.*, 1998) que atribui um valor de qualidade para cada uma das bases, e o programa Phrap (EWING *et al.*, 1998) que gera uma sequência consenso com base na sobreposição das sequências obtidas utilizando parâmetros de alinhamento e qualidade atribuídas pelo programa Phred para realizar a montagem das sequencias (EWING *et al.*, 1998). A ferramenta Consed/Autofinish foi utilizada para visualizar a montagem criada pelo programa Phrap.

Foram feitas buscas de similaridade no banco de dados do *GenBank* através do programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) que identifica regiões de similaridade local entre as sequências, podendo ser usado para inferir relações evolutivas e funcionais entre as sequências, assim como para ajudar a identificar os membros de famílias proteicas (ALTSCHUL *et al.*, 1990). O BLAST disponível no sítio do NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - www.ncbi.nlm.nih.gov) foi

utilizado para comparar as sequências de nucleotídeos. As buscas foram realizadas no período de outubro de 2016.

5.3 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE EM CAMPO PULSADO (PFGE)

A eletroforese em campo pulsado foi realizada para as estirpes de *Aeromonas* visando definir o número de clones circulantes no estado do Paraná e Rio Grande do Sul, e a respectiva relação com eventuais surtos e/ou casos esporádicos de diarreia.

Como não havia metodologia de PFGE padronizada para *Aeromonas*, foi adaptado o protocolo desenvolvido para *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Shigella* pelo PulseNet (<http://www.cdc.gov/pulsenet/>). PulseNet é uma instituição que compreende uma rede de laboratórios que analisa, identifica e conecta casos de doença provocadas por alimentos a fim de detectar surtos.

As condições utilizadas estão descritas a seguir.

5.3.1 Condições de cultivo

As bactérias foram cultivadas em ágar tríptico de soja (TSA), a 36°C por cerca de 14h e então utilizadas para preparar suspensões com absorbância (610nm) de 0,8-1 em tampão de suspensão celular (CSB). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Braenderup ATCC BAA-664, foi utilizada como marcador de massa molecular, e processada juntamente com as estirpes de *Aeromonas*.

5.3.2 Preparo dos blocos

Um volume de 400 µl das suspensões celulares foi transferido para microtubos de plástico de 1,5 ml aos quais foram adicionados 20 µl de proteinase K (20mg/ml), seguido de homogeneização. Então 400 µl de agarose de baixo ponto de fusão foram adicionados aos microtubos, que foram novamente homogeneizados e então os conteúdos foram transferidos para moldes plásticos. Após a solidificação do gel, as bactérias imobilizadas nos blocos de agarose foram submetidas ao processo de lise.

5.3.3 Lise das Células Bacterianas

Os blocos foram transferidos para tubos contendo tampão de lise (50mM de Tris: 50mM de EDTA pH 8,0 e 1% de Sarcosyl) e proteinase K (0,1mg/ml), e mantidos em banho-maria a 54°C por 4 horas. Após este período, a solução tampão foi removida e os blocos foram lavados 3 vezes com água ultra-pura estéril, pré-aquecida a 50°C, por 10 minutos. Em seguida os blocos foram lavados 3 vezes, por 15 minutos cada,

com TE (Tris-Edta, pH 8.0) estéril, pré-aquecido a 50°C. Antes de proceder à etapa de restrição, os blocos de agarose contendo DNA foram submetidos a uma corrida de PFGE a fim de verificar a qualidade do DNA.

5.3.4 Restrição do DNA

A digestão do DNA genômico foi realizada a 37°C por 18h colocando cerca de 1/3 do bloco de agarose (aproximadamente 2 mm) em contato com a solução contendo 20 µl do tampão Tango 10X, água ultrapura estéril 177 µl e 3 µl da enzima *XbaI* (30U da enzima de restrição). Após a incubação os plugs foram deixadas em repouso à temperatura ambiente por 5 minutos e então colocadas nos poços de um gel de agarose SeaKem Gold a 1% preparada em TBE 0,5X.

5.3.5 Eletroforese em Campo Pulsado

A separação dos fragmentos de DNA foi realizada em gel de agarose a 1% em solução tampão TBE 0,5X (45mM Tris; 45mM ácido bórico; 1mM EDTA) utilizando o sistema de eletroforese CHEF DR III System (Bio-Rad) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR. Cerca de 1/3 dos blocos foram transferidos para os orifícios do gel que a seguir foram vedados com a mesma agarose. A corrida eletroforética foi realizada em tampão Tris-Borato-EDTA 0,5X. Os parâmetros de corrida foram tempo inicial-final de 1-25 segundos, 200V por 18,5 h, 120°. O gel foi corado com brometo de etídio, visualizado sob luz UV e registrado com câmera digital.

5.3.6 Análise dos Perfis

Os perfis de PFGE gerados pela enzima *XbaI* foram comparados visualmente utilizando o critério descrito por Barrett e colaboradores (2006), que consideram como distintos perfis que apresentem qualquer diferença no número e tamanho de bandas.

As imagens dos géis foram analisadas com o software *BioNumerics 7.5* (*Applied Maths, Keijkstraat, Belgium*) e os padrões de bandas foram comparados utilizando o método de Dice para gerar a matriz de similaridade e o UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic mean*) para gerar o dendrograma com os critérios de 1,5% de otimização e 1,5% de tolerância de bandas.

5.4 SEQUENCIAMENTO DO DNA GENÔMICO

Foi sequenciado o genoma da estirpe *A. trota* 1999LCR isolada originalmente de líquido cefalorraquidiano e previamente identificada através de testes bioquímicos e RFLP de 16S rDNA (VIZZOTTO, 2009).

5.4.1 Condições de cultivo

A. trota 1999LCR foi cultivada em ágar nutriente incubado a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18-24 horas. As colônias foram analisadas quanto à morfologia colonial e pureza, analisadas microscopicamente após coloração de Gram, para confirmação da morfologia e reação tintorial, e também quanto à atividade de citocromo oxidase.

5.4.2 Isolamento do DNA genômico

O DNA genômico da bactéria foi purificado utilizando o “High Pure PCR Template Preparation kit” (Roche®) conforme instruções do fabricante. A concentração de DNA foi determinada utilizando o kit “Quant-it Pico Green dsDNA assay” (Invitrogen®) e o Fluorímetro GloMax®-Multi+Detection System com Software Instinct (Promega®).

5.4.3 Sequenciamento de DNA genômico de *A. trota* 1999LCR

O genoma foi sequenciado utilizando a plataforma 454 GS Jr (Roche®) e o sistema Illumina MiSeq™ (Illumina, Inc) . As reações foram realizadas de acordo com o protocolo estabelecido pelos fabricantes.

5.4.3.1 454 GS Jr (Roche®)

A primeira etapa consiste na construção da biblioteca contendo os fragmentos de DNA fita simples representando a sequência completa da amostra. Cada fragmento é flanqueado por adaptadores que permitem a amplificação, e a posterior purificação e quantificação do DNA a ser sequenciado. Após o preparo da biblioteca de fragmentos, segue-se a etapa de amplificação clonal baseada em PCR em emulsão (emPCR) que consiste na amplificação da biblioteca de fragmentos de DNA isolados, formando dezenas de milhares de cópias por *bead*. Posteriormente aproximadamente 500.000 esferas contendo DNA são transferidas para a placa de sequenciamento “*PicoTiterPlate*” previamente preparada, e então são adicionados a mistura de enzimas que são depositadas em camadas sobre os poços da placa *PicoTiterPlate*. As

informações das reações em todos os poços são capturadas pela câmera do sequenciador. Os dados brutos consistem de uma coleção de imagens digitais a partir das quais a sequência de nucleotídeos dos fragmentos da biblioteca de DNA é determinada pelo computador auxiliar, através do *software* de processamento de dados *GS Data Analysis* versão 2.7.

5.4.3.2 Sequenciamento pelo Illumina Miseq™

O sequenciamento na plataforma Illumina Miseq™ foi realizado no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

Nessa plataforma, o sequenciamento é baseado na síntese da molécula de DNA, utilizando a enzima DNA polimerase e nucleotídeos terminadores marcados com fluoróforos (CARVALHO, SILVA, 2010). O processamento dos dados obtidos na plataforma Illumina foi realizado com o *software* CASAVA versão 1.8.2, o qual executa a análise de imagens captadas pelo detector, o alinhamento dos *reads* da corrida de sequenciamento e subsequente montagem dos *contigs*.

5.4.4 Montagem e Anotação do Genoma

As sequências obtidas foram montadas utilizando o software SPADIS v.3.5.0. (BANKEVICH et al., 2012), disponível no endereço <http://bioinf.spbau.ru/spades>.

A anotação do genoma foi realizada com o "Rapid Annotation using Subsystem Technology" (RAST), versão 2.0, um sistema automatizado para a anotação de genomas bacterianos (AZIZ et al., 2008; OVERBEEK et al., 2014).

O genoma de *A. trota* 1999LCR também foi analisado com o programa MUMmer versão 3.0 (*Maximal Unique Matches* – <http://mummer.sourceforge.net>) utilizando a ferramenta PROmer, assim foi possível ordenar os *contigs* do genoma. Este programa é um sistema para o alinhamento de genomas (KURTZ et al., 2004). O sistema MUMmer é acondicionado como três módulos independentes: construção da *suffix tree* (árvore sufixo), classificação e extração do LIS (*longest increasing subsequence* – maior subsequência crescente) e na produção de alinhamentos Smith-Waterman para todas as regiões em MUM's (*maximal unique match* – correspondência única máxima) (DELCHER et al., 1999).

5.4.5 Detecção de Ilhas Genômicas

Em micro-organismos podem existir regiões do genoma que podem apresentar um conteúdo C+G diferente da sequência principal. Essas regiões são denominadas ilhas genômicas, as quais podem estar associadas com resistência a antibióticos,

metabolismo, simbiose ou patogenicidade (HACKER e KAPER, 2000). Para a anotação de ilhas genômicas foi utilizado o programa *Zisland Explorer* (http://cefg.uestc.edu.cn/Zisland_Explorer/), que divide a sequência genômica em fragmentos utilizando o conteúdo de GC para prever ilhas no restante dos fragmentos (WEI et al., 2016).

5.4.6 Average Nucleotide Identity – ANI

A calculadora ANI (*Average Nucleotide Identity Calculator*) desenvolvida pelo laboratório Kostas (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/>) estima a identidade média de nucleotídeos entre dois genomas (KONSTANTINIDIS E TIEDJE, 2005). Nessa metodologia, o genoma é fragmentado “in silico” em segmentos de 1.020 nucleotídeos, os quais são alinhados utilizando o algoritmo do BLAST contra um genoma de referência a fim de calcular a identidade média dos nucleotídeos (GORIS et al., 2007).

O genoma de *A. trota* 1999LCR foi mapeado frente a todas as espécies de *Aeromonas* depositadas no NCBI (*National Center of Biotechnology Information* – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com genoma completo. Para *A. trota* apenas drafts genomas estavam disponíveis até o mês de outubro de 2016.

5.4.7 Genome-to-Genome Distance Calculator – GGDC

Os cálculos realizados pelo GGDC são baseados na hibridização DNA-DNA (DDH) para obter uma estimativa da semelhança global entre dois genomas em estudo. Foi utilizado o GGDC (*Genome-to-Genome Distance Calculator* – <http://http://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php/>) versão 2.0, que calcula as distâncias intergenômicas e os dados são convertidos em valores de similaridade análogas ao DDH para apoiar a decisão sobre o parentesco da nova estirpe com estirpes conhecidas (MEIER-KOLTHOFF, 2013; AUCH, KLENK e GÖKER, 2010). A sequência de contigs de *A. trota* 1999LCR foi mapeada frente a todas as espécies de *Aeromonas* depositadas no NCBI (*National Center of Biotechnology Information* – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com genoma completo até o mês de outubro de 2016.

5.5 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

As bactérias foram cultivadas em ágar Luria Bertani (ALB) e incubadas a 37°C durante 18-24 horas. Então foram preparadas suspensões bacterianas em caldo Luria Bertani (CLB) com turvação similar ao tubo 0,5 da escala de MacFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia/ml). Em seguida, 200 µL destas suspensões foram transferidos para três tubos de polipropileno, incubadas por

24h em estufa bacteriológica à 30°C. Após a incubação, o conteúdo dos tubos foi vertido e os mesmos lavados com água destilada. A revelação do biofilme foi realizada com a adição de 200 µL de cristal violeta 1% por 10 minutos à temperatura ambiente, e então os tubos foram novamente lavados e secos em estufa. A seguir foram adicionados 200 µL de etanol 95% por 15 minutos para a solubilização do corante retido no biofilme, e o sobrenadante foi transferido para uma microplaca de 96 poços e a densidade óptica (DO) determinada em comprimento de onda de 570nm (SANTOS et al., 2011). Os ensaios foram realizados em triplicata. A estirpe de *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi utilizada como controle positivo, por ser forte formadora de biofilme, como controle negativo foi utilizado o meio de cultura sem adição de inóculo.

Para determinar a capacidade formadora de biofilme das estirpes de *Aeromonas* foi considerado como referência a DO do meio de cultura sem inóculo.

5.5 MOTILIDADE *SWIMMING* E *SWARMING*

Os ensaios de motilidade do tipo *swimming* e *swarming* foram realizados segundo Grim e colaboradores (2014), exceto que para o teste de *swarming* foi adicionado *tween* 80/0,005% (v/v) ao meio LB (Shaw, comunicação pessoal).

Para o ensaio de *swimming* as bactérias foram inoculadas no centro de uma placa, contendo meio LB com 0,3% de ágar, através de uma picada no meio com auxílio de agulha bacteriológica. Ao completar 24h de incubação, as amostras foram analisadas para a presença de *swimming* através da distância de migração no meio. Como controle positivo de *swimming* foi utilizado *P. mirabilis* ATCC 25933.

Após essa etapa, as estirpes foram inoculadas em meio LB contendo 0,5% de ágar para a realização dos ensaios de *swarming*. A inoculação foi realizada centralmente na superfície do meio utilizando o crescimento bacteriano mais externo do teste de *swimming*. Como controle positivo para *swarming* foi utilizado *P. mirabilis* ATCC 25933 e como controle negativo *A. hydrophila* ATCC7966.

As bactérias foram avaliadas para presença ou ausência de *swarming* em 18h e em 24h de incubação.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram analisados 90 estirpes de *Aeromonas* isoladas de pacientes dos estados do Paraná e Rio Grande do Sul, previamente caracterizadas através de métodos bioquímicos (VIZZOTTO, 2009; SUREK *et al.*, 2010; PREDIGER, 2012; ASSIS *et al.*, 2014; nossos dados não publicados), quanto ao perfil de PFGE, à motilidade e capacidade de formação de biofilme. Dessas estirpes oitenta e cinco também foram analisadas pelo sequenciamento de *gyrB*.

6.1 SEQUENCIAMENTO DO GENE *gyrB*

Devido a reclassificações frequentes e modificações nas descrições, a taxonomia do gênero *Aeromonas* permanece confusa para os microbiologistas que não trabalham rotineiramente com esses micro-organismos (ABBOTT, 2003; JANDA e ABBOTT, 2010). Além disso, a pesquisa de *Aeromonas* não é parte da rotina da maioria dos laboratórios clínicos (GHENGHESH *et al.*, 2008), e a sua identificação requer a realização de vários testes bioquímicos (ABBOTT, CHEUNG, JANDA, 2003) parte deles não disponíveis nesses laboratórios.

No entanto, a identificação molecular ainda apresenta aplicações limitadas na identificação de *Aeromonas* devido principalmente à baixa frequência de infecções humanas em países desenvolvidos e a existência de poucos dados indicando a necessidade da identificação além do nível de complexo (ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003). Mas a importância da utilização dos métodos moleculares pode ser percebida em estudo realizado com bactérias isoladas de peixe, fenotipicamente identificadas como *Aeromonas*, que mostrou que 76% delas realmente pertenciam a este gênero e também que havia elevada taxa de discordância na identificação ao nível de espécie enfatizando a importância da identificação molecular de *Aeromonas* (BEAZ-HIDALGO *et al.*, 2010).

Além disso, a identificação molecular é importante ao menos em algumas condições, incluindo a identificação definitiva de isolados com propriedades bioquímicas aberrantes, casos de doença recorrente, na descrição de padrões de resistência associados com *Aeromonas*, estudos epidemiológicos e vigilância em saúde pública e na pesquisa (JANDA e ABBOTT, 2010).

Considerando as dificuldades na identificação ao nível de espécie de bactérias do gênero *Aeromonas*, que as informações disponíveis sobre estas bactérias são limitadas no país e que a definição das espécies circulantes no Estado é importante para estudos epidemiológicos, decidimos realizar a identificação molecular de isolados

clínicos, previamente caracterizados através de métodos bioquímicos, utilizando sequenciamento do gene *gyrB*. Foram analisados 85 isolados de *Aeromonas* pelo sequenciamento de *gyrB*. As sequências consenso obtidas variaram entre 900 a 1100 pb. Os resultados estão indicados na Tabela 3.

TABELA 3. COMPARAÇÃO ENTRE A IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Aeromonas*

Isolados	Identificação Bioquímica	Identificação Molecular	Score total	Cobertura	Identidade
L4	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	1730	93%	98%
L6	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	1624	100%	99%
L9	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	1689	98%	99%
L11	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	1339	83%	96%
L14	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	1131	100%	99%
L18	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	1526	100%	98%
L19	<i>A. aquariorum</i>	<i>A. aquariorum</i>	1310	87%	97%
L20	<i>A. veronii</i> bv sobria	<i>A. veronii</i>	1851	99%	99%
L26	<i>A. veronii</i> bv sobria	<i>A. veronii</i>	1934	99%	99%
L29	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	1319	100%	98%
L32	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>	1874	100%	99%
L35	<i>A. veronii</i> bv sobria	<i>A. veronii</i>	1810	99%	99%
L36	<i>A. veronii</i> bv sobria	<i>A. veronii</i>	1454	99%	99%
L37	<i>A. veronii</i> bv sobria	<i>A. veronii</i>	1761	98%	97%
L38	<i>A. veronii</i> bv sobria	<i>A. veronii</i>	1083	83%	95%
L39	<i>A. veronii</i> bv sobria	<i>A. veronii</i>	1701	98%	99%
L40	<i>A. veronii</i> bv sobria	<i>A. veronii</i>	1696	100%	97%
L42	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	1083	98%	99%
L43	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	1054	99%	99%
L44	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	1025	98%	98%
L45	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	1256	81%	94%
L46	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	1406	100%	97%
L47	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	1306	100%	99%
L50	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	1567	100%	92%
L51	<i>A. veronii</i> bv sobria	<i>A. veronii</i>	1905	100%	99%

L56	<i>A.caviae</i>	<i>A.caviae</i>	931	77%	92%
L59	<i>A.caviae</i>	<i>A.caviae</i>	1867	100%	97%
L61	<i>A.caviae</i>	<i>A.caviae</i>	1801	99%	98%
L62	<i>A.caviae</i>	<i>A.caviae</i>	906	69%	97%
L63	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.hydrophila</i>	1609	97%	99%
L64	<i>A.caviae</i>	<i>A.caviae</i>	1126	81%	92%
L66	<i>A.caviae</i>	<i>A.caviae</i>	1265	100%	100%
L67	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A.veronii</i>	1856	100%	99%
L68	<i>A.caviae</i>	<i>A.caviae</i>	1662	100%	99%
L70	<i>A.veronii</i> bv sobria	<i>A.veronii</i>	1828	99%	97%
L73	<i>A.caviae</i>	<i>A.caviae</i>	1451	100%	99%
L74	<i>A.caviae</i>	<i>A.caviae</i>	1476	100%	99%
MS100	<i>A.caviae</i>	<i>A.caviae</i>	1837	99%	99%
MS10	<i>A.caviae</i>	<i>A.caviae</i>	1874	99%	99%
LM16	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. hydrophila</i>	1130	98%	99%
MS16	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.hydrophila</i>	1757	100%	99%
MS207	Complexo <i>A.caviae</i>	<i>A.media</i>	1617	100%	99%
MS210	<i>A.veronii</i> bv sobria	<i>A.veronii</i>	1896	71%	98%
MS235	<i>A.caviae</i>	<i>A.caviae</i>	1878	99%	98%
MS297	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.hydrophila</i>	1935	98%	98%
MS312	<i>A.veronii</i> bv sobria	<i>A.veronii</i>	1676	99%	98%
MS346	<i>A.caviae</i>	<i>A.caviae</i>	1775	100%	99%
MS423	Complexo <i>A.caviae</i>	<i>A.media</i>	1597	94%	94%
L49H	<i>A.veronii</i> bv sobria	<i>A.veronii</i>	1871	100%	99%
MS547	<i>A.caviae</i>	<i>A.caviae</i>	1945	100%	99%
54LM	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.hydrophila</i>	1824	98%	98%
MS55OB	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A.veronii</i>	1819	100%	98%
MS594	<i>A.caviae</i>	<i>A.caviae</i>	1077	98%	99%
LM59	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.hydrophila</i>	1153	75%	93%
FA68	<i>A.veronii</i> bv sobria	<i>A.veronii</i>	819	65%	87%
MS8	<i>A.caviae</i>	<i>A.caviae</i>	1907	99%	99%
MS92	<i>A.caviae</i>	<i>A.caviae</i>	1671	99%	99%
FA93	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.hydrophila</i>	1070	95%	100%
FA97	<i>A.caviae</i>	<i>A.caviae</i>	950	60%	97%
LM5	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.hydrophila</i>	928	95%	97%
LM6	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.hydrophila</i>	1052	97%	99%
LM7	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.hydrophila</i>	1056	98%	99%
LM8	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.hydrophila</i>	1083	97%	99%
LM9	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.hydrophila</i>	1050	98%	99%

LM1	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	2181	90%	99%
LM2	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	1725	97%	97%
LM3	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	1025	100%	99%
LM11	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	861	96%	96%
LM12	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	1065	98%	99%
LM13	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	975	96%	99%
LM14	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	1194	99%	99%
LM15	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	1052	97%	98%
BV3	Complexo <i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	1673	95%	96%
LM19	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	1065	99%	99%
1999LCR	<i>A. trota</i>	<i>A. enteropelogenes</i>	1846	97%	99%
BV1	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. caviae</i>	1465	100%	99%
BV2	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>	1703	87%	97%
BV4	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	1750	96%	98%
BV6	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>	795	71%	97%
BV7	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>	1900	99%	99%
BV8	<i>A. veronii</i> bv sobria	<i>A. veronii</i>	1752	85%	99%
BV9	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>	1703	97%	97%
BV11	<i>A. caviae</i>	<i>A. punctata</i>	798	87%	94%
LM18	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	1187	98%	98%

Legenda: Estão indicados os resultados da análise pelo BLASTn das sequências do gene *gyrB* das *Aeromonas* analisadas. Para definir a espécie foi considerado o maior valor de score. O resultado de E foi de 0.0 para todas as sequências/bactérias. *Aeromonas* sp - não foi possível definir a espécie com base nas características bioquímicas. Em negrito destaca-se a bactéria cujo genoma foi sequenciado.

FONTE: O autor (2016).

A ferramenta molecular mais utilizada para a identificação bacteriana é o sequenciamento do gene 16S rRNA (JANDA e ABBOTT, 2010). No entanto, essa metodologia é problemática para *Aeromonas* devido a heterogeneidade intragenômica dos operons *rrn*, cuja frequência de polimorfismos varia de 0,06 a 1,5% (MORANDI et al., 2005; ALPERI et al., 2008). Assim, a análise de sequência do gene 16S rRNA pode ser insuficiente para a diferenciação de espécies (YAMAMOTO et al., 1999), sendo útil apenas para a identificação de gênero (KÜPFER et al., 2006).

Um dos genes utilizados no estabelecimento das relações filogenéticas entre organismos é *gyrB*, que codifica a subunidade B da DNA girase, enzima que introduz super enrolamentos negativos no DNA (DRLICA e ZHAO, 1997). A utilização do gene *gyrB* apresenta vantagens uma vez que a transferência horizontal é limitada e este gene está presente em todos os grupos de bactérias (WATANABLE et.al., 2001). O sequenciamento de *gyrB* apresenta boa separação das espécies e foi considerado útil

para a identificação simultânea de espécies e estirpes de *Aeromonas* devido à diversidade observada na sua sequência (YÁÑEZ et al., 2003).

O sequenciamento de *gyrB* confirmou que as 85 estirpes analisadas pertencem ao gênero *Aeromonas* (TABELA 3). No total, 71 (83,5%) estirpes foram corretamente identificadas ao nível de espécie pelos métodos microbiológicos convencionais. Destas, 70 foram identificadas, utilizando os testes propostos por Abbott, Cheung e Janda (2003) incluindo 23 estirpes de *A. hydrophila* e 32 de *A. caviae*. No entanto, uma estirpe identificada fenotipicamente como *A. caviae* (BV11) a maior similaridade na sequência de *gyrB* foi observada com *A. punctata* (TABELA 3). Este resultado não reflete incongruência entre a identificação fenotípica e a molecular, mas somente na sinonímia. A nomenclatura *A. punctata* foi proposta em 1957, e *A. caviae* quase 30 trinta anos depois e vem sendo a mais utilizada (JANDA e ABBOTT, 2010).

O mesmo foi observado com a estirpe identificada fenotipicamente como *A. trota*, uma espécie raramente associada com infecções em humanos (JANDA e ABBOTT, 2010; LAI et al., 2007). A espécie foi inicialmente isolada de casos de gastroenterite (CARNAHAN et al., 1991) e posteriormente associada com infecções de feridas e choque séptico (LAI et al., 2007). Destaca-se entre as suas características fenotípicas a resistência à cefalotina (ABBOTT, CHEUNG e JANDA 2003; CARNAHAN et al., 1991) e, diferentemente da maioria das *Aeromonas* a suscetibilidade à ampicilina (ABBOTT, CHEUNG e JANDA 2003; CARNAHAN et al., 1991; LAI et al., 2007). A descrição de *A. enteropelogenes* (SCHUBERT et al., 1990) e *A. trota* (CARNAHAN et al., 1991) ocorreu quase que simultaneamente, e verificou-se a seguir que ambas eram indistinguíveis fenotipicamente e em estudos de hibridização de DNA. A nomenclatura *A. trota* é mais citada (JANDA e ABBOTT, 2010).

Quinze estirpes caracterizadas fenotipicamente como *A. veronii* bv sobria foram identificadas molecularmente como *A. veronii* (TABELA 3). Cabe aqui ressaltar que a espécie *A. veronii* contém 2 biogrupos geneticamente idênticos que apresentam reações bioquímicas diferentes. O primeiro *A. veronii* bv veronii (HG10) apresenta reação positiva para ornitina descarboxilase; o segundo, *A. veronii* bv sobria (HG8) é negativo para ornitina descarboxilase e arginina dihidrolase positivo. O último deve ser diferenciado da espécie ambiental *A. sobria* (HG7) fenotipicamente similar, mas geneticamente e clinicamente distinta (ABBOTT, CHEUNG e JANDA 2003; MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005). Em relação às sequências depositadas no GenBank que apresentaram similaridade com as de *A. veronii* bv sobria analisadas neste trabalho não encontramos informação quanto ao biogrupo, apenas que se tratava de *A. veronii*.

A estirpe de *A. aquariorum* também teve sua identificação fenotípica confirmada pelo sequenciamento de *gyrB*. Esta estirpe foi inicialmente identificada como *A. hydrophila* utilizando as provas microbiológicas convencionais, e como *A. caviae* pelo perfil de RFLP de 16S rDNA (VIZZOTTO, 2009). Portanto, uma discrepância entre as duas metodologias. A descrição da espécie *A. aquariorum*, sua associação com infecções intestinais e extra-intestinais em humanos e respectivas características bioquímicas, indicando que a bactéria poderia ser erroneamente identificada como *A. hydrophila* (FIGUERAS et al., 2009; ARAVENA-ROMÁN et al., 2011), permitiu re-identificar a estirpe L19 como *A. aquariorum*. As últimas podem ser diferenciadas de *A. hydrophila* pela inabilidade de usar lactato e produzir ácido a partir da L-arabinose e a maioria utiliza citrato ou produz alquilulfatase. Em contraste, as estirpes de *A. hydrophila* produzem ácido a partir da L-arabinose e poucas (26%) utilizam citrato ou produzem alquilulfatase (ARAVENA-ROMÁN et al., 2011). A identificação da estirpe L19 foi também confirmada com a descrição de perfis de RFLP de 16S rDNA para *A. aquariorum* que apresentam o mesmo perfil de *A. caviae* ou similar com 1 ou 2 bandas extras (FIGUERAS et al., 2009; PUTUCHEARY et al., 2013).

Recentemente, com base em árvores filogenéticas derivadas de sequências concatenadas de *gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ* e *gyrA* foi confirmado que *A. aquariorum* e *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* constituem um único táxon diferente de outras subespécies de *A. hydrophila* corroborando as análises de hibridização DNA-DNA. Assim, ambas as bactérias foram re-classificadas como *Aeromonas dhakensis* (BEAZ-HIDALGO et al., 2013). Análises de sequência de genomas completos também confirmam que *A. dhakensis* é uma nova espécie e que muitas dessas foram erroneamente identificadas como *A. hydrophila* (COLSTON et al., 2014; BEAZ-HIDALGO et al., 2015). Dessa forma as identificações fenotípica e molecular da estirpe L19 estão corretas requerendo, no entanto, atualização em relação à nomenclatura.

A elevada taxa de concordância entre a identificação fenotípica e molecular de *Aeromonas* encontrada no presente trabalho diverge dos resultados encontrados em outro estudo no qual a taxa de identificação fenotípica correta foi de apenas 32%. Naquele estudo foram utilizados RFLP de 16S rDNA e, para parte das estirpes, sequenciamento de *rpoD*. Somente 21% das bactérias identificadas como *A. hydrophila* realmente pertenciam a esta espécie, enquanto para *A. salmonicida* os resultados foram concordantes em 88% dos casos (BEAZ-HIDALGO et al., 2010). Após a reavaliação dos testes fenotípicos foram observadas contradições em relação aos testes para a identificação de *A. sobria* o que contribuiu para aperfeiçoar os dados sobre as características bioquímicas da espécie. O estudo conclui que uma das maiores dificuldades na identificação fenotípica de *Aeromonas* é a variedade de

condições e metodologias empregadas para a realização dos testes bioquímicos que produzem resultados diferentes e/ou inconsistentes, e a importância dos métodos moleculares para esclarecer o número considerável de discrepâncias na identificação bioquímica de isolados clínicos e ambientais contribuindo para a correta identificação desse grupo de bactérias (BEAZ-HIDALGO et al., 2010).

Quanto às demais estirpes, a caracterização bioquímica realizada de acordo com Abbott, Cheung e Janda (2003) não permitiu a identificação da espécie, portanto as bactérias foram classificadas como pertencentes ao complexo *A. caviae* ou *Aeromonas* spp.

Através do sequenciamento de *gyrB* todas as bactérias do complexo *A. caviae* foram identificadas como *A. media* (TABELA 3), que é parte do complexo juntamente com *A. caviae* e *A. eucrenophila* (ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003)

Em relação às bactérias caracterizadas como *Aeromonas* spp, 4 espécies foram identificadas: *A. veronii*, *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. media* (TABELA 3). Portanto, foi observada elevada taxa de concordância entre a identificação bioquímica e molecular das bactérias estudadas e o sequenciamento de *gyrB* permitiu a identificação ao nível de espécie das bactérias identificadas apenas ao nível de gênero ou complexo através de testes fenotípicos.

6.2 ELETROFORESE DE CAMPO PULSADO (PFGE)

A caracterização de linhagens patogênicas é fundamental para fins epidemiológicos. Nas últimas décadas, a identificação de linhagens bacterianas baseada em características fenotípicas cedeu espaço para as abordagens genotípicas como *Pulsed-Field Gel Eletroforesis* (PFGE).

A técnica de PFGE é uma das mais aceitas e utilizadas na epidemiologia molecular (TENOVER et al., 1995) tanto para estudos de surtos hospitalares de pequenas proporções (DARINI et al., 1999) quanto na comparação de populações bacterianas isoladas em diferentes regiões geográficas (LIU et al., 1999). É considerada padrão ouro nos estudos epidemiológicos devido à alta capacidade discriminatória, robustez e reprodutibilidade, no entanto é uma técnica demorada e trabalhosa (WATTIAU et al., 2011).

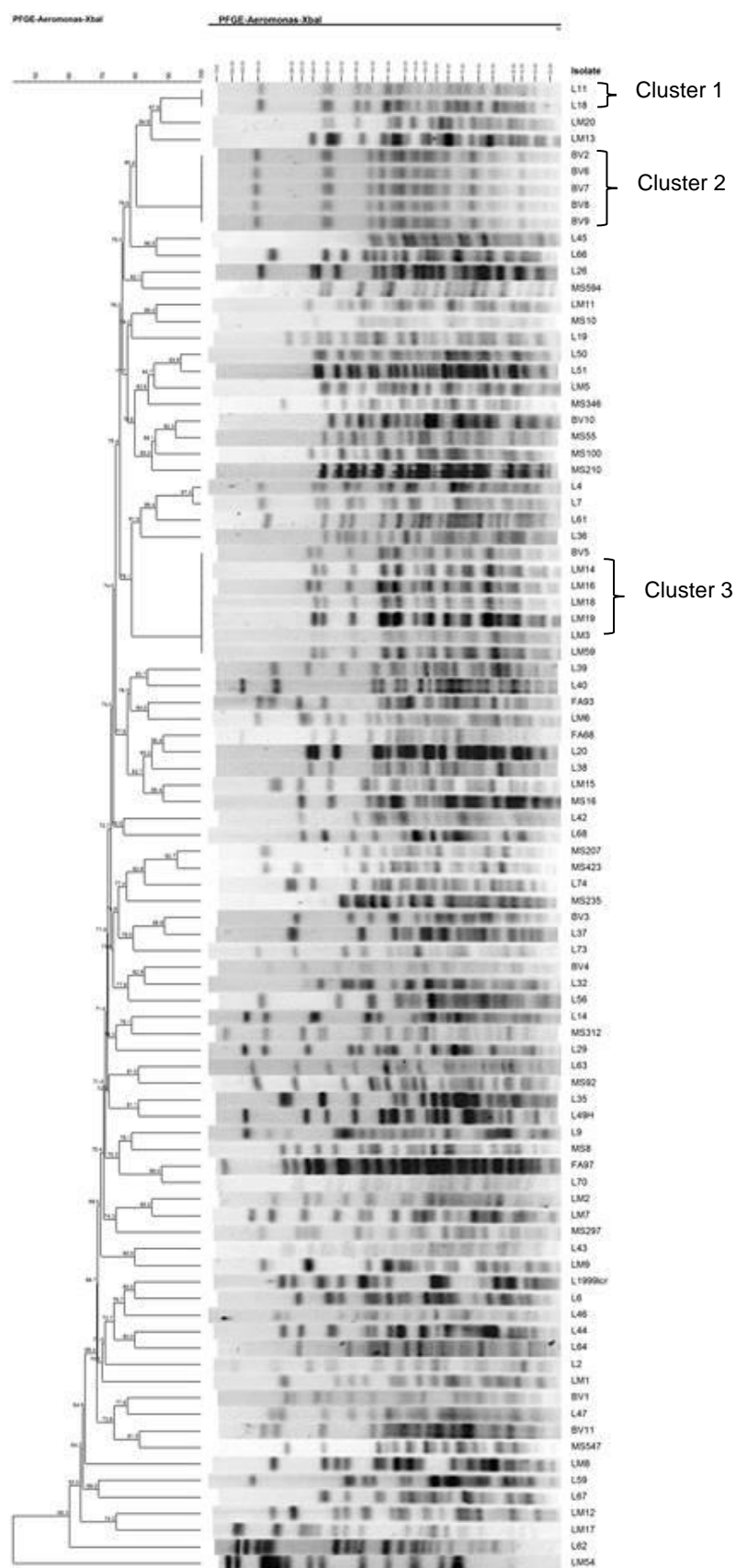
Neste trabalho a técnica de PFGE foi utilizada para comparar 90 estirpes de *Aeromonas* isoladas predominantemente de casos de diarreia ocorridos no Paraná e Rio Grande do Sul, e de pessoas do Paraná com ferimentos infectados. A metodologia desenvolvida e padronizada pelo PulseNet International para *E. coli*, *Salmonella* e *Shigella* (PNL05, 2013) foi adaptada para *Aeromonas* uma vez que não há um

protocolo estabelecido para estas bactérias. A digestão foi realizada com a enzima *Xba*I e as condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos subitem 5.3.5.

Os perfis obtidos para as estirpes de *Aeromonas* spp. apresentam de 20-30 bandas de DNA genômico com tamanho variando de aproximadamente 10 a 450 kb.

O critério utilizado para definir os perfis de PFGE foi o proposto Barrett, Gerner-Smidt e Swaminathan (2006) que consideram como perfis distintos aqueles que apresentarem qualquer diferença no número e posição de bandas. Assim, observa-se uma grande diversidade nos perfis de PFGE (Figura 1), com 79 perfis distintos identificados entre as 90 estirpes analisadas (Figura 2). Resultados similares foram encontrados por Borchardt e colaboradores (2003) ao analisarem por PFGE estirpes de *Aeromonas* isoladas de fezes e de amostras de água potável em Wisconsin, EUA. Entre as 65 estirpes foram identificados 58 perfis distintos de PFGE. Hänninen e Hirvelä-Koski (1998) ao estudarem a diversidade genética de *Aeromonas* mesofílicas de diferentes grupos de hibridização, verificaram que as estirpes pertencentes a um mesmo grupo apresentavam perfis de bandas distintos. Os dados indicam elevada diversidade genética entre *Aeromonas*.

FIGURA 1: DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE ESTIRPES DE *Aeromonas*



Legenda: Dendrograma representando a relação genética entre os 90 isolados de *Aeromonas*. Estão indicados os perfis de PFGE de DNA genômico dos isolados de *Aeromonas* tratados com a enzima *Xba*I, e a respectiva bactéria na coluna "isolate". Os números representam a similaridade genética entre as bactérias. Os *clusters* identificados estão destacados. O padrão de bandas foi comparado pela análise de *cluster* usando o coeficiente de similaridade de Dice e UPGMA para gerar o dendrograma com otimização de 1,5% e tolerância na posição das bandas de 1,5%.

FONTE: O autor (2016)

Por outro lado, entre estirpes de *A. caviae* e *A. hydrophila* isoladas de água mineral natural durante um período de 3 anos apenas um perfil foi identificada para cada uma das espécies indicando sua natureza clonal. Já as estirpes isoladas de águas superficiais apresentaram elevada heterogeneidade nos perfis (VILLARI et al., 2003). Conclui-se que a clonalidade das estirpes encontradas em água mineral natural poderia ser uma consequência de desenvolvimento localizado de biofilme (VILLARI et al., 2003).

Apenas três *clusters* foram identificados entre as estirpes analisadas no presente trabalho. Um deles (*Cluster 1*) corresponde à restrição do DNA genômico de 2 estirpes de *A. caviae* denominadas respectivamente L11 e L18 que apresentam perfis indistinguíveis (Figura 1).

Outro *cluster* (2) contém 5 estirpes de *A. veronii* bv sobria denominadas respectivamente BV2, BV6, BV7, BV8 e BV9, que foram isoladas de fezes de pacientes com diarreia em Santa Maria no Rio Grande do Sul no mesmo período, o que sugere a ocorrência de um surto. No Brasil há relato de um possível surto associado com *Aeromonas* ocorrido em 2004 em São Bento do Una, Pernambuco (HOFER et al., 2006; LOPES et al., 2015). No entanto foi realizada apenas a identificação bioquímica e verificou-se que as estirpes de *Aeromonas* eram heterogêneas, sendo *A. caviae* prevalente. Também não há surto de diarreia associado com um único clone de *Aeromonas* documentado (JANDA e ABBOTT, 2010). Assim, bactérias do *cluster* II que são indistinguíveis pelo PFGE poderiam representar um surto associado com o mesmo clone de *A. veronii* bv sobria.

O *cluster* 3 inclui 7 estirpes de *A. hydrophila* designadas respectivamente LM3, LM14, LM16, LM18, LM19 e LM59 isolados de ferida de pacientes de Curitiba, e BV5 isolado de fezes em Santa Maria (RS). Um surto de pústulas e feridas infectadas associado com *A. hydrophila* foi descrito na Austrália em 26 pessoas que participaram de uma competição de futebol na lama (VALLY et al., 2004). Poderia-se especular se os isolados de Curitiba poderiam representar um surto, no entanto não dispomos de informações a respeito da data de isolamento dessas estirpes.

Em resumo, os resultados de PFGE mostram que as estirpes de *Aeromonas* analisadas apresentam elevada heterogeneidade genética. Isto poderia, em parte, ser explicado pelo fato de que as estirpes foram isoladas de diversas regiões geográficas. Além disso as bactérias vêm sendo coletadas desde 1999 e eventuais clones prevalentes poderiam ter sido substituídos ao longo do tempo.

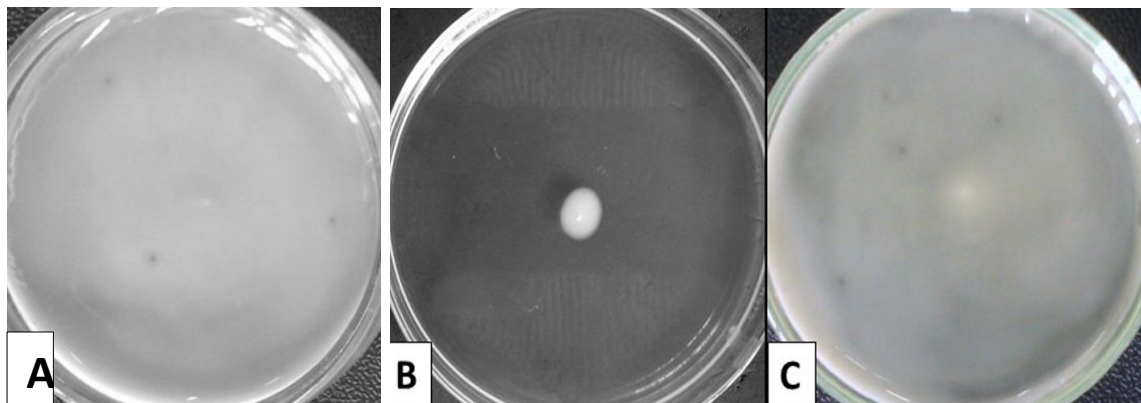
6.3 ENSAIOS DE MOTILIDADE E FORMAÇÃO DE BIOFILME

Vários estudos demonstram que *Aeromonas* são eficazes colonizadores de superfícies, assim como importantes constituintes de biofilmes bacterianos (KIROV et al., 2004; MERINO et al., 2006; SANTOS et al. 2011). Como tanto a motilidade e a habilidade de formar biofilme estão associadas com virulência (STOODLEY et al., 2004; JANDA e ABBOTT, 2010; GRIM et al., 2014) as 90 estirpes de *Aeromonas* foram analisadas quanto a essas características.

Foram realizados ensaios de motilidade tipo *swimming* e *swarming* e o ensaio de formação de biofilme foi realizado em tubos de polipropileno.

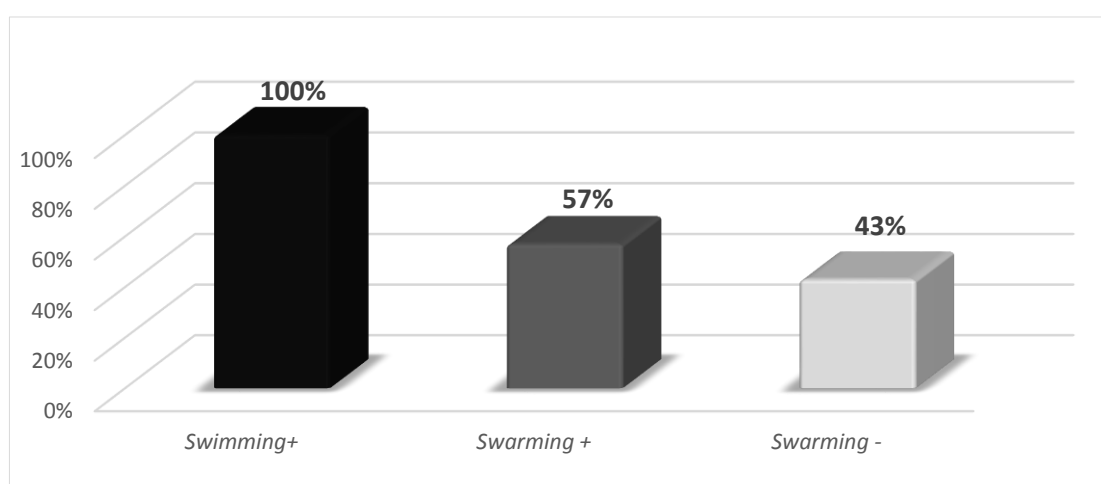
Todas as estirpes apresentaram motilidade tipo *swimming* (Figuras 3 e 4). As espécies mesofílicas de *Aeromonas* geralmente são móveis (ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003) e contém flagelo polar monotríquio, expresso constitutivamente em todas as condições de cultura, e associado com a motilidade tipo *swimming* em meios líquidos (KIROV et al., 2002; JANDA e ABBOTT, 2010). Estudos com mutantes para proteínas associadas com o flagelo polar abolem a motilidade tipo *swimming*, e mostraram que a função do flagelo polar na motilidade e aderência inicial são fundamentais para a colonização de células do epitélio gastrointestinal (KIROV et al., 2002, 2004).

A Figura 2 representa resultados dos ensaios de motilidade *swimming* e *swarming*.

FIGURA 2: MOTILIDADE DO TIPO *SWIMMING* E *SWARMING*

Legenda: **A.** Cultura de *A. caviae* L62 inoculada em meio LB contendo 0,3% de ágar utilizado para determinar a motilidade tipo *swimming*, observa-se a disseminação da bactéria em toda a placa, o que caracteriza teste de *swimming* positivo. **B, C.** Culturas em meio LB contendo 0,5% de ágar e 0.005% de tween 80 utilizado para determinar a motilidade tipo *swarming*. Bactérias retiradas da placa de *swimming* são inoculadas na superfície do ágar. Em B observa-se apenas o crescimento no ponto de inoculação, indicando a inability em produzir *swarming* (*A. hydrophila* ATCC 7966, controle negativo), em C. observa-se o espalhamento da bactéria na superfície do meio (*Proteus mirabilis*, controle positivo).
FONTE: O autor (2016).

Os resultados dos ensaios de motilidade tipo *swimming* e *swarming* estão indicados na Figura 3.

FIGURA 3: RESULTADOS DOS ENSAIOS FENOTÍPICOS DE MOTILIDADE DO TIPO *SWIMMING* E *SWARMING*

FONTE: O autor (2016).

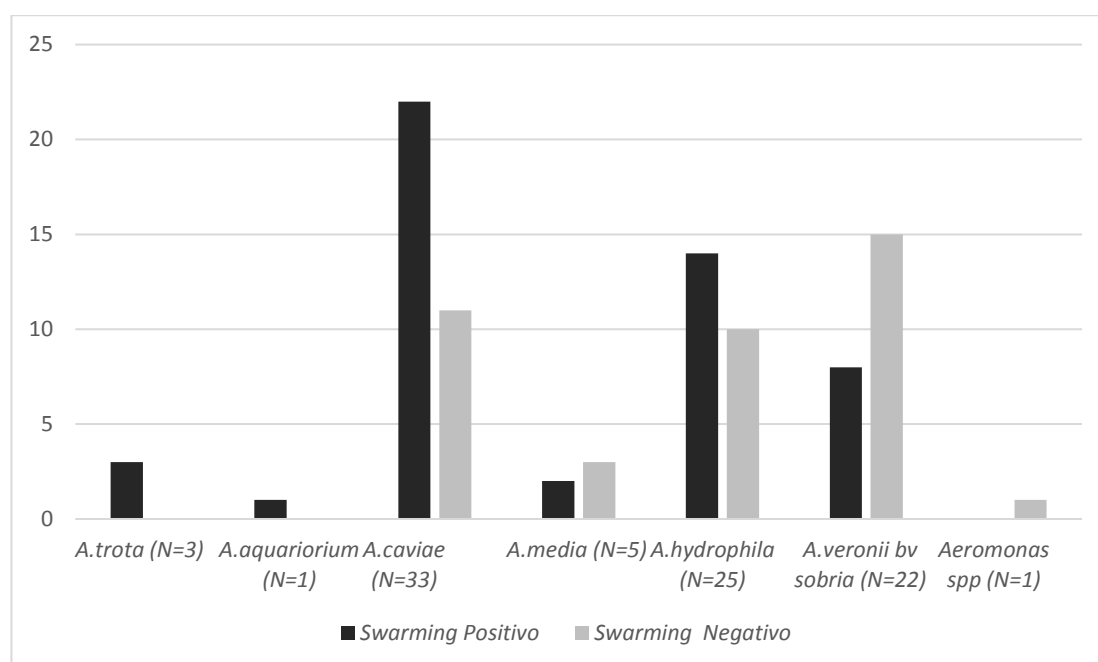
Cerca de 60% das *Aeromonas* mesofílicas são capazes de expressar múltiplos flagelos laterais, estruturas associadas com a habilidade de *swarming*, motilidade em

superfícies sólidas (KIROV et al., 2002, 2004; GAVIN et al., 2002; MERINO et al., 2006). Neste estudo a expressão de flagelos laterais não foi determinada.

Kirov e colaboradores (2002) mostraram que mutantes de *A. caviae* Sch3N que não expressam flagelos laterais apresentam motilidade tipo *swimming*, mas são incapazes de apresentar *swarming* indicando que tais estruturas são requeridas para a motilidade em superfícies. Portanto, considerando o estudo de Kirov e colaboradores (2002) os resultados da motilidade tipo *swarming* poderiam indicar a expressão de flagelos laterais nas estirpes em estudo. Assim, 51 (57%) das bactérias analisadas neste trabalho apresentariam estas estruturas, o que é compatível com dados da literatura (KIROV et al., 2002; GAVIN et al., 2002).

A FIGURA 4 representa a capacidade de *swarming* de acordo com a espécie.

FIGURA 4: HABILIDADE DAS ESPÉCIES DE *Aeromonas* EM EXPRESSAR MOTILIDADE TIPO *SWARMING*



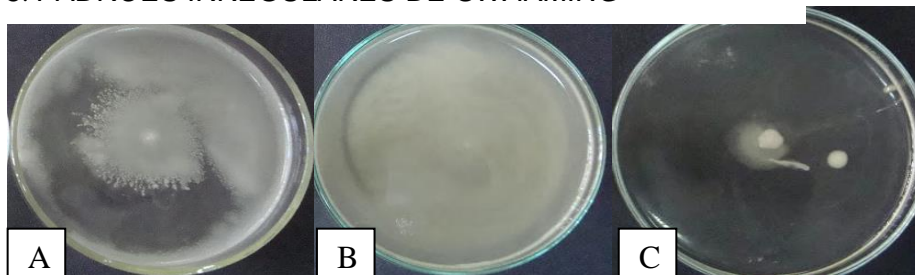
FONTE: O autor (2016).

A habilidade de *swarming* foi observada em todas as espécies (Figura 5), mas foi mais comum entre *A. caviae* (67%) e *A. hydrophila* (58%). Em *A. veronii* bv sobria a maioria (65%) não expressou essa habilidade.

Durante a realização dos ensaios de *swarming* foi observado um efeito interessante em 23 estirpes. Diferente do crescimento e disseminação uniforme sobre a superfície do ágar estas bactérias apresentaram padrões irregulares após 24h de incubação, como mostrado na FIGURA 5. Estes padrões já foram descritos como

migração em vórtex, *bull's eye* e nuvem (KEARNS, 2010) e foram observados respectivamente em 10, 5 e 8 estirpes. No entanto quando o ensaio foi repetido os resultados não foram reproduzidos, sugerindo o efeito de algum fator ambiental (KEARNS, 2010).

FIGURA 5: PADRÕES IRREGULARES DE *SWARMING*



Legenda: Perfis atípicos de *swarming* exibidos por algumas estirpes após incubação por 24h. A. Formação em vórtex. B. Formação em *bull's eye*. C. Formação em nuvem.

FONTE: O autor (2016).

A motilidade tipo *swarming* é um mecanismo importante para a adaptação da bactéria em diferentes ambientes (MERINO et al., 2006), colonização do meio ambiente e de tecidos animais (PARTRIDGE e HARSHEY, 2013), uma vez que o flagelo lateral contribui para a adesão em células do hospedeiro e formação de biofilme, além de permitir expansão da área de colonização (MERINO et al., 2006). A presença de ambos os flagelos polar e lateral contribui para a formação de biofilme GAVIN et al., 2002; KIROV et al., 2004; CANALS et al., 2006).

Para a realização do ensaio de formação de biofilme em tubos de polipropileno, e para estabelecer os critérios de interpretação, inicialmente foram testadas *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 25922. Foram realizados 6 ensaios independentes em triplicata. Foi observada elevada variação na leitura espectrofotométrica dos resultados cuja média e desvio padrão estão indicados na TABELA 4.

TABELA 4: ENSAIOS DE BIOFILME UTILIZADOS PARA DEFINIR OS CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO

Micro-organismo	Média das Triplicatas	Desvio Padrão
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,287	0,092
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	2,436	0,641
Meio sem inóculo	0,210	0,062

Legenda: Média e Desvio Padrão da absorbância em 570nm de 6 ensaios independentes de formação de biofilme em tubos de polipropileno. Os ensaios foram realizados em triplicata.

FONTE: O autor (2016).

Para cada ensaio de biofilme realizado para as estirpes de *Aeromonas* foram utilizados como controles *P. aeruginosa* ATCC 27853 (controle positivo) e o meio de cultura sem bactérias inoculadas. Devido à variação (cerca de 30%) observada nos ensaios iniciais (TABELA 4) foi estabelecido como critério para considerar como formadoras de biofilme apenas as bactérias que apresentassem no mínimo leitura maior ou igual à do meio não inoculado mais 3 desvios padrões.

Os resultados dos ensaios de biofilme para as estirpes de *Aeromonas* estão indicados na TABELA 5 comparados com os resultados da motilidade tipo *swarming*.

TABELA 5: SWARMING E FORMAÇÃO DE BIOFILME EM AEROMONAS

Swarming (N, %)	Biofilme + (N)	Biofilme – (N)
Positivo (51; 57%)	39	12
Negativo (39; 43%)	29	10
Total	68 (76%)	22 (24%)

Legenda: Os números representam as bactérias classificadas de acordo com a motilidade do tipo *swarming* observada e a capacidade de formação de biofilme em polipropileno.

FONTE: O autor (2016)

Os resultados indicam que a maioria das estirpes (76%) foi capaz de produzir biofilme. No entanto, ao comparar essa habilidade entre as bactérias capazes de fazer *swarming* 39/51 (76,5%) ou não 29/39 (74,4%) não houve diferença entre elas. Esse resultado é inesperado uma vez que foi demonstrado que flagelos laterais são requeridos para a aderência aumentada de *A. caviae* e *A. hydrophila* a células epiteliais humanas e formação de biofilmes; a perda completa desses flagelos resultou em redução de 85% na aderência (GAVIN et al., 2002).

Os resultados também diferem de outro estudo que revela que apenas 24% de *A. caviae* expressando apenas o flagelo polar foram capazes de formar biofilme contra 94% das estirpes que expressaram ambos os tipos de flagelos (SANTOS et al., 2010).

A presença de flagelos laterais não foi determinada no presente trabalho, mas inferida a partir da habilidade de *swarming* que foi fortemente correlacionada com a expressão dessas estruturas (KIROV et al., 2002).

Outro fator que poderia estar relacionado com os resultados obtidos inclui o material utilizado para a realização do ensaio, polipropileno, enquanto em outros estudos os materiais empregados foram poliestireno (GAVIN et al., 2002; SANTOS et al., 2010) e tubos de vidro de borossilicato (KIROV et al., 2004). Fatores ambientais, as propriedades do material (STOODLEY et al., 2002) como carga elétrica,

hidrofobicidade e microtopografia do substrato (POULSEN, 1999), e as características da célula bacteriana como taxa de crescimento podem influenciar a formação de biofilme (STOODLEY et al., 2002; MEYER, 2003).

6.4 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO

A estirpe *A. trota* 1999LCR foi selecionada para o sequenciamento do genoma uma vez que esta espécie ainda é pouco estudada. Além disso, foi isolada a partir do líquido céfalo raquidiano de paciente com meningite (FARAH, S. Comunicação pessoal) doença raramente associada com *Aeromonas* com apenas 19 casos reportados na literatura (BUTTER e MAHIEU, 2013; PAMPÍN, et al., 2012; KUMAR, 2014; SALUNKE, et al., 2015). Nenhum deles associado com *A. trota*.

Essa estirpe foi previamente estudada em nosso laboratório quanto a presença de genes de virulência e verificou-se que a mesma apresenta os genes *aerA* e *lip* e que codificam respectivamente a hemolisina *aerA* e a enzima lipase. Outros ensaios mostraram que essa bactéria causa efeitos citotóxicos em células HRT 18 como *rounding* e vacuolização; em células HeLa, *rounding* e condensação nuclear e atividade hemolítica contra eritrócitos humanos (WOLF, 2012).

O *draft* genoma da estirpe *A. trota* 1999LCR foi obtido utilizando os sequenciadores 454 GS Junior Titanium series (Roche) e Illumina Miseq (Illumina Inc.) e os protocolos estabelecidos pelos fabricantes. A TABELA 6 representa os resultados obtidos em ambos os sequenciadores.

TABELA 6: RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO NOS EQUIPAMENTOS 454 GS JR E ILLUMINA

	454GSJr	Illumina
Reads	66.994	2.198.994
Tamanho médio das reads (pb)	421	270.75
Tamanho (pb)	28.199.665	595.382.872

FONTE: O autor (2016).

A montagem do genoma, realizada pelo software SPAdes v.3.5.0, resultou em 18 contigs, e o tamanho estimado do genoma 4,33 Mb. Esses dados sugerem que *A. trota* 1999LCR apresenta genoma menor que *A. hydrophila* ATCC 7966 4.74 Mb (SESHADRI et al., 2006), *A. salmonicida* A449 4.7 Mb (REITH et al., 2008), *A. veronii* 4.55 Mb (LI et al., 2011), *A. caviae* Ae398 4.43 Mb (BEATSON et al., 2011) e *A. caviae* 8LM 4.47 Mb (MORIEL et al., 2015).

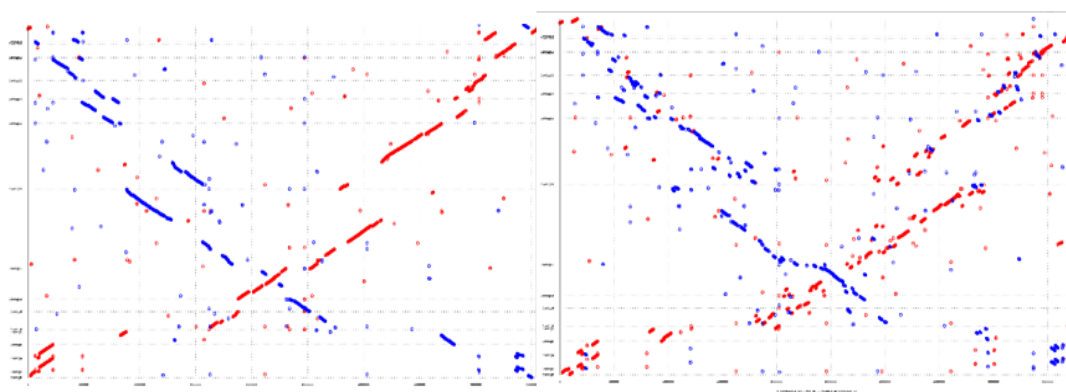
O conteúdo de C+G foi de 60%, valor dentro da proporção 57-63% descrita para *Aeromonas* (MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005) e confirmada nos genomas sequenciados que apresentaram valores variando de 58,5% observados em *A. salmonicida* A449 a 61.8% para *A. caviae* 8LM (REITH et al., 2008; MORIEL et al., 2015).

A sequência foi depositada no DDBJ/ EMBL/ GenBank, sob o número de acesso JMGO02000000. Este foi o primeiro genoma de *A. trota* a ser sequenciado.

Análises comparativas entre o genoma de *A. trota* 1999LCR e o de outras espécies de *Aeromonas* foram realizadas utilizando o *software* MUMmer versão 3.0. Este *software* alinha genomas e mapeia cada base gerando informações sobre regiões conservadas, substituições de nucleotídeos, inserções, repetições *in tandem*, e possibilita a análise de sintonia, entre outras (KURTZ et al., 2004). Os resultados são mostrados em gráficos de *dotplot* onde cada similaridade é representada por um ponto, e por estes estarem muito próximos acabam formando retas, assim quanto mais pontos alinhados formando uma reta maior o grau de conservação das sequências.

A Figura 7 representa os resultados das comparações em gráfico *dotplot* do genoma de *A. trota* 1999LCR com genomas de referência de *A. veronii* B565 e *A. hydrophila* ATCC 7966. Nessa figura pode-se visualizar o grande número de sequências com ordem inversa ao genoma de referência.

FIGURA 6: ANÁLISE COMPARATIVA DE GENOMAS DE *AEROMONAS*



Lenda: Comparação dos genomas de *A. trota* 1999LCR com *A. veronii* B565 (esquerda) ou *A. hydrophila* ATCC 7966 (direita) cujos genomas estão completos. Os genomas de referência são representados no eixo y e o de *A. trota* no eixo x. Os pontos representados em vermelho fora da reta demonstram que a sequência analisada é similar ao genoma de referência (eixo y), mas encontra-se em locais diferentes neste genoma. Os pontos em azul indicam que a sequência é similar mas apresenta-se no sentido reverso complementar à sequência do genoma de referência.

Observa-se que há regiões de colinearidade entre os genomas, mas não apresentam boa similaridade o que dificulta sua utilização para a ordenação dos *contigs* de *A. trota*.

6.4.1 Average Nucleotide Identity (ANI) e Genome-to-genome Distance Calculator (DDH)

A calculadora ANI (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/>) estima a identidade média de nucleotídeos entre dois genomas, sendo que os valores de ANI entre genomas de uma mesma espécie devem estar acima de 95%.

O *software* *Genome-to-genome Distance Calculator*, GGDC 2.0 (<http://ggdc.dsmz.de>), se baseia na hibridização DNA-DNA (DDH), amplamente aplicado para obter uma estimativa da semelhança global entre os genomas de dois organismos. Isolados que apresentam valor de DDH acima de 70% são considerados da mesma espécie.

A sequência de nucleotídeos do genoma de *A. trota* 1999LCR foi mapeada frente a todas as espécies de *Aeromonas* com genoma completo e com os drafts de *A. trota* depositadas no NCBI (*National Center of Biotechnology Information* – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), até janeiro de 2016.

Isolados que apresentam valor de DDH acima de 70% e valores de ANI superiores a 95% são considerados como pertencentes a mesma espécie. A estirpe de *A. trota* 1999LCR apresenta alto valor de DDH (77,30% e 76,70%) e de ANI (97,27% e 97,20%) (TABELA 9) com as estirpes de *A. trota* CECT4255T e *A. trota* CECT4487 respectivamente, uma vez que pertencem a mesma espécie da estirpe em estudo. No entanto, comparando-se a estirpe *A. trota* 1999LCR com a estirpe *A. trota* LK14, o DDH foi de 29,9% e o ANI forneceu um valor de 86,76%, o que não é esperado para a mesma espécie, o que sugere que a estirpe de *A. trota* LK14 não pertence a essa espécie e que houve um erro de identificação, uma vez que as espécies de *Aeromonas* apresentam grande semelhança bioquímica, o que torna difícil sua identificação laboratorial. Esse achado em relação à estirpe LK14 é reforçado por estudo recente (Beaz-Hidalgo et al., 2015) no qual a afiliação taxonômica de genomas de 44 *Aeromonas* depositados no NCBI foi determinado através de análise filogenética multilocus (MLPA) e ANI. Resultados inconsistentes com as análises filogenéticas foram observados para 14 dos genomas dos quais 12 eram de bactérias erroneamente identificadas. Entre eles, 2 correspondem aos genomas designados como *A. veronii* AMC34 e *A. hydrophila* 4AK4 que com base no ANI e MLPA poderiam representar duas novas espécies. A maioria dos genomas erroneamente identificada foi descrita

como *A. hydrophila* (Beaz-Hidalgo et al., 2015). *A. trota* 1999LCR, também incluída na análise de Beaz-Hidalgo e colaboradores (2015), teve sua identidade confirmada.

TABELA 7: CÁLCULO DA DISTÂNCIA INTERGENÔMICA ENTRE O GENOMA DE *A. trota* 1999LCR E AS ESPÉCIES DE *Aeromonas* DEPOSITADAS NO NCBI

Estirpes depositadas no NCBI	ANI	DDH
<i>A. aquariorum</i> AAK1	86,69	29,80
<i>A. caviae</i> ARGOS75	85,43	28,40
<i>A. caviae</i> ARGOS72	85,34	28,40
<i>A. trota</i> CECT4255T	97,27	77,30
<i>A. trota</i> CECT4487	97,20	76,70
<i>A. trota</i> LK14	86,76	29,90
<i>A. hydrophila</i> 4AK4*	85,22	28,30
<i>A. hydrophila</i> 4H10	86,26	28,30
<i>A. hydrophila</i> AL06	86,20	29,70
<i>A. hydrophila</i> ML09_119	86,25	29,90
<i>A. hydrophila</i> AL09_71	86,27	29,90
<i>A. hydrophila</i> NJ_35	86,22	29,90
<i>A. hydrophila</i> ATCC7966**	86,28	30,00
<i>A. media</i> WS**	85,18	28,40
<i>A. salmonicida</i> A449**	84,56	27,70
<i>A. veronii</i> B565**	85,90	30,30
<i>A. veronii</i> TH0426	85,81	30,10
<i>A. veronii</i> VNIH1	85,94	30,50
<i>A. hydrophila</i> YL17*	86,86	31,00

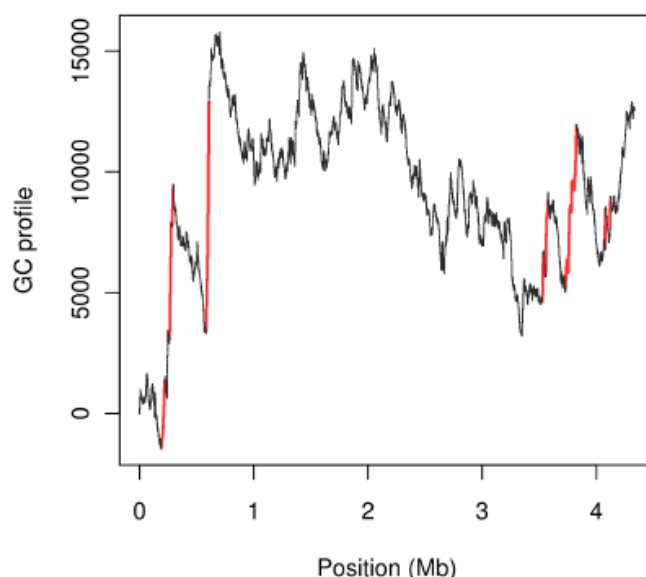
Legenda: Resultados obtidos para o ANI e DDH entre *A. trota* 1999LCR e as estirpes listadas. Negrito indica os maiores valores para as estirpes analisadas frente à *A. trota* 1999LCR. *A. hydrophila* 4AK4* e *A. hydrophila* YL17* foram classificadas como *Aeromonas* sp.nov. e *A. dhakensis* respectivamente em trabalho realizado por Beaz-Hidalgo (2015). As estirpes assinaladas com ** foram também analisadas por Beaz-Hidalgo (2015) e suas identidades confirmadas.

FONTE: O autor (2016).

6.4.2 Detecção de Ilhas Genômicas

O software Zisland Explorer (http://cefg.uestc.edu.cn/Zisland_Explorer/), é uma ferramenta de anotação de ilhas genômicas não supervisionada, que depende de um algoritmo de segmentação automática. Ele divide a sequência genômica em fragmentos usando a ferramenta de perfil GC, para prever ilhas no restante dos fragmentos (WEI et al., 2016). A análise pelo Zisland Explorer sugere a presença de 9 ilhas genômicas no genoma de *A. trota* 1999LCR, os resultados estão indicados na Figura 7 e Tabela 8.

FIGURA 7: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA LOCALIZAÇÃO DAS ILHAS GENÔMICAS PREVISTAS EM *A. trota* 1999LCR



Legenda: As linhas em vermelho representam as ilhas genômicas previstas, e a respectiva posição e GC *profile*.

FONTE: http://cefg.uestc.edu.cn/Zisland_Explorer/upload.php

O programa utiliza uma estratégia para identificar ilhas genômicas que combina dois métodos: o GC *profile* que segmenta o genoma de acordo com a similaridade na composição das 4 bases e seleciona o core genoma com o programa de clusterização e índice H do perfil GC cumulativo e o genoma é então analisado para obter candidatos a ilhas; a seguir a identificação das ilhas genômicas é baseada na combinação de desvios na utilização de aminoácidos, uso de códons e valor H (WEI et al., 2016).

TABELA 8: ILHAS GENÔMICAS PREVISTAS EM *A. trota* 1999LCR

Ilha Genômica (contig)	Posição (Início-Fim; pb)	Tamanho (pb)	Número de genes	Score
GI1 (contig 10)	189042-221714	32673	29	0,266
GI2 (contig 10)	262273-275252	12980	11	0,650
GI3 (contig 10)	285335-295597	10263	10	0,432
GI4 (contig 10)	582903-607415	24513	14	0,626
GI 5 (contig 5)	1391-9694	8304	7	0,615
GI 6 (contigs 5 e 7)	29783-17557	19385	18	0,429
GI 7 (contigs 7 e 8)	171751-40431	96538	75	0,295
GI 8 (contig 9)	129638-135654	6017	7	0,650
GI 9 (contig 9)	174034-180383	6350	5	0,419

Fonte: http://cefg.uestc.edu.cn/Zisland_Explorer/upload.php

Análises de genomas tem mostrado que os genomas bacterianos consistem de um mosaico de segmentos de DNA em relação ao conteúdo de G+C. A maior porção, geralmente cerca de 70% a 80%, apresenta teor de G+C homogêneo, típico de cada espécie. Este “core” genoma conservado e estável contém a informação genética que é requerida para as funções celulares essenciais. Em contraste o resto do genoma contém regiões de DNA com conteúdo de G+C diferente da sequência principal formando um “pool” flexível que inclui elementos genéticos móveis como transposons, plasmídeos e profagos e regiões instáveis que foram designadas “ilhas genômicas” (HACKER e KAPER, 2000; HACKER e CARNIEL, 2001; GAL-MOR e FINLAY, 2006; DOBRINDT et al., 2010). Estas ilhas genômicas podem ser subdivididas dependendo da função dos genes que codificam em Ilhas Ecológicas, Ilhas de “fitness”, Ilhas de Simbiose e de Ilhas de Patogenicidade que contribuem para a virulência bacteriana (HACKER e KAPER, 2000). Em espécies não patogênicas, as ilhas genômicas são importantes na evolução e influenciam resistência a antibióticos, simbiose e adequação e adaptação (DOBRINDT, et al., 2010).

Como o genoma de *A. trota* 1999LCR não está completo, não foi possível identificar os genes presentes nas 9 ilhas genômicas utilizando o programa *Zisland Explorer*.

6.4.3 Anotação automática

A anotação automática do genoma foi realizada utilizando “*The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology*” (RAST) versão 4.0 (AZIZ et al., 2008). Este programa identifica genes codificadores de proteínas, bem como de rRNA e tRNA, atribui funções para os genes, prevê quais subsistemas estão representados no genoma, construindo uma rede metabólica (AZIZ et al., 2008). O RAST determina as funções dos genes utilizando uma biblioteca crescente de subsistemas e famílias de proteínas (RUTHERFORD et al., 2000) o que permite uma comparação entre sistemas similares entre muitos genomas e a detecção de variações nos diferentes microrganismos, levando a uma anotação rápida e acurada (AZIZ et al., 2008).

O RAST identificou no genoma de *A. trota* 1999LCR, 3877 sequências codificadoras (CDS), 123 RNAs ribossômicos e transportadores. A utilização de outro software, ARAGORN (LASLETT e CANBACK, 2004) para análise de RNAs indicou a presença de 128 tRNAs e 4 operons de rRNA.

O mesmo número de genes codificando tRNAs foi identificado no genoma de *A. hydrophila* ATCC 7966, primeiro genoma de *Aeromonas* a ser sequenciado. Este

número representa uma elevada proporção quando comparado a outros genomas e poderia estar relacionado com a habilidade de responder rapidamente a modificações das condições ambientais (SESHADRI et al., 2006). No entanto isso parece ser comum entre *Aeromonas* com 110 genes codificando tRNAs em *A. salmonicida* A449 (REITH et al., 2008) e 102 em *A. veronii* (LI et al., 2011). Aparentemente *A. trota* contém menor número de operons de rRNA que outras espécies, 9 em *A. salmonicida* A449 e 10 em *A. hydrophila* ATCC 7966 e *A. veronii* (SESHADRI et al., 2006; REITH et al., 2008; LI et al., 2011).

Os genes anotados pelo RAST foram alocados em diferentes subsistemas como indicado na TABELA 9.

TABELA 9: GENES ANOTADOS PELO RAST EM SUBSISTEMAS

Subsistema	Número de genes
Cofatores, vitaminas, grupos prostéticos, pigmentos	290
Parede celular e cápsula	171
Virulência, doença e defesa	95
Metabolismo de potássio	32
Fotossíntese	0
Miscelânea	37
Fagos, profagos, elementos transponíveis, plasmídeos	1
Transporte de membrana	202
Aquisição e metabolismo de ferro	50
Metabolismo de RNA	213
Nucleosídeos e nucleotídeos	124
Metabolismo de proteínas	291
Divisão celular e ciclo celular	40
Motilidade e quimiotaxia	181
Regulação e sinalização celular	89
Metabolismo secundário	4
Metabolismo de DNA	103
Ácidos graxos, lipídeos e isoprenóides	135
Metabolismo de nitrogênio	22
Dormência e esporulação	3
Respiração	153
Resposta ao estresse	148
Metabolismo de compostos aromáticos	11

Aminoácidos e derivados	500
Metabolismo de enxofre	42
Metabolismo de fósforo	47
Carboidratos	435

FONTE: "The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST)

Vários transportadores para carboidratos estão presentes no genoma de *A. trota* LCR 1999, o que é consistente com a capacidade da bactéria utilizar diferentes tipos desses compostos. De acordo com os resultados do Biolog GN2 que contém 95 fontes de carbono distintas, essa bactéria é capaz de utilizar monossacarídeos como D-glicose, frutose, galactose, arabinose e psicose; dissacarídeos como maltose, sacarose, trealose, lactose, e polissacarídeos como dextrina e glicogênio, e o álcool derivado de açúcar como manitol (PREDIGER, 2015). Enzimas associadas com a utilização de vários monossacarídeos e polissacarídeos foram identificadas no genoma da bactéria. O genoma de *A. trota* LCR1999 também contém o conjunto completo de genes para a via glicolítica, coerente com a habilidade da bactéria em utilizar glicose.

6.5 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

A anotação pelo RAST no item "Virulência, doença e defesa" indicou a presença de 95 genes. Entre esses, 68 foram associados a resistência aos antimicrobianos e compostos tóxicos. Em relação aos antimicrobianos foram preditos o *locus* para Resistência a Múltiplos Antibióticos (MAR; 1 gene), resistência a fluoroquinolonas (4 genes), resistência à fosfomicina (1 gene), beta-lactamase (1) e bombas de efluxo para resistência à multidrogas (20 genes).

O antibiograma realizado para *A. trota* 1999LCR mostrou que a bactéria é resistente à cefalotina e cefazolina mas sensível às demais drogas testadas: ampicilina, amoxicilina-clavulanato, cefepime, cefoxitina, ceftazidima, ceftriaxona, imipenem, meropenem, aztreonam, amicacina, gentamicina, tetraciclina, ciprofloxacina, levofloxacina, trimetoprim-sulfametoxazol e cloranfenicol (VIZZOTTO, 2009).

As beta-lactamases são enzimas capazes de hidrolisar o anel beta-lactâmico de drogas desse grupo. No entanto, existem cerca de 1000 tipos diferentes dessas enzimas, cada qual com atividade hidrolítica específica contra determinadas drogas ou muitas delas (BUSH e JACOBY, 2005).

Assim, a beta-lactamase detectada no genoma de *A. trota* 1999LCR apresenta atividade hidrolítica contra cefalotina e cefazolina, mas não é capaz de hidrolisar o anel beta-lactâmico dos outros antimicrobianos beta-lactâmicos que foram testados (ampicilina, amoxicilina-clavulanato, cefepime, ceftazidima, ceftriaxona, imipenem, meropenem, aztreonam). Isto sugere que seja uma cefalosporinase de espectro de ação reduzido que hidrolisa apenas cefalosporinas de primeira geração.

A expressão da proteína de resistência à fosfomicina FosA não pode ser verificada uma vez que esta droga não foi testada e não faz parte daquelas utilizadas de rotina no antibiograma em nosso meio (OPLUSTIL, et al., 2010).

A resistência às fluoroquinolonas está associada com mutações em regiões designadas como ‘quinolone resistance – determining regions’ (QRDR) dos genes *gyrA* (códon 83 e 92) e *parC* (códon 80) (ALCAIDE et al., 2010; SHAKIR et al., 2012).

Foram testadas duas fluoroquinolonas: ciprofloxacina e levofloxacina para as quais a bactéria apresentou suscetibilidade. Portanto é possível que tenha havido falha na anotação pelo RAST que associou a resistência às fluorquinolonas com os genes *parC* e *parE* que codificam respectivamente as subunidades A e B da Topoisomerase IV, e os genes *gyrA* e *gyrB* que codificam as subunidades A e B da DNA girase, respectivamente.

Em relação às demais drogas também não foi detectada resistência, o que sugere também falhas na anotação. No entanto não se pode excluir a possibilidade de que ao menos em alguns casos essa resistência seja do tipo induzível. Além disso, outras drogas não utilizadas de rotina devem ser testadas.

6.6 VIRULÊNCIA

A virulência de *Aeromonas* é poligênica ou multifatorial, envolvendo uma complexa interação entre as bactérias e o hospedeiro (JANDA, 1991; JANDA e ABBOTT, 2010, PABLOS et al., 2010, TÓMAS, 2012). Diversas características associadas com a virulência de *Aeromonas* já foram descritas (GRIM et al., 2013, 2014).

Aeromonas são capazes de produzir uma série de produtos com atividade toxigênica tais como enterotoxinas, citotoxinas, aerolisinas e hemolisinas (SINGH e SANYAL, 1992; WONG, HEUZENROEDER e FLOWER, 1998; CHOPRA e HOUSTON, 1999; MARTINS, MARQUEZ e YANO, 2002), lipases, amilases, chitinases, nucleases, e gelatinases (TÓMAS, 2012), além da habilidade em aderir às células epiteliais através de adesinas e pili (SCOARIS et al., 2008).

Embora a anotação realizada pelo RAST tenha indicado a presença de alguns genes associados com virulência, foi feita pesquisa manual para verificar a presença

no genoma de *A. trota* de genes já associados com virulência em estirpes de *Aeromonas*. Para isso foi utilizada a ferramenta BlastP.

A TABELA 10 indica os fatores de virulência identificados na busca pelo BLASTp. Alinhamentos com no mínimo 50% de identidade e 50% de cobertura foram considerados para inferir a homologia. A origem das sequências utilizadas na busca está indicada na Tabela 10. Além desses genes também foram pesquisados Pilus Flp tipo IV (AHA1450-1459), Fimbria Tipo IV (AHA0518-0519), Fimbrilina (AHA0062), Toxina Rtx (AHA1359), Enterotoxina Citolítica (Act) (AHA0438), Metaloprotease (AHA3471), Protease Extracelular (EprA1) (AHA2712-2713), Hemolisina Extracelular AHH1 (AHA1512), Enterotoxina citotônica termo lábil (Alt) (L77573.1) no entanto estes não foram detectados no genoma de *A. trota* 1999LCR.

TABELA 10: FATORES ASSOCIADOS COM VIRULÊNCIA EM *Aeromonas* PROCURADOS EM *A. trota* 1999LCR ATRAVÉS DO SOFTWARE BLASTP.

Função	Locus ou Proteína	Id (%)	Cobertura (%)	Referência
Biosíntese de Pilus	AHA0686-0696	63-91	86-100	Seshadri et al., 2006
	AHA3190-3194	67-88	91-100	
Pilus Msh tipo IV*	AHA0383-0399	62-96	69-100	
Tap Type IV pilus*	AHA3868-3871	86-96	95-100	
Adesina	AHA3491	67	100	
Flagelo Polar*	AHA1365-1391	79-100	61-100	
	AHA1698-1703	69	100	
	AHA2832-2847	63-97	85-100	
	AHA2824-2826	88-93	99-100	
Enterotoxina Citotônica heat-stable (Ast)	AHA0804	84	98	
Hemolisina/cupin-like	AHA0229	85	100	
Hemolisina III	AHA3493	87	99	
Hemolisina termoestável	AHA3217	81	93	
Fosfolipase A1	AHA0104	84	100	
Hialuronidase	AHA1474	85	100	
Invasina	AHA1066	29	43	
Enolase	AHA0821	97	100	
	AHA0994	81	89	
Colagenase	AHA0517	70	100	
Serina Protease	AHA2687	83	100	
AerA	AAC26217.1	100	100	Khan et al., 1998
Flagelo Lateral *	AAZ95846.1-847.1; AAZ95852.1;	79-98	100	Canals et al., 2006

	AAZ99729.1-756.1; AAZ95855.1; AAK20919.1-927.1	56-95	61-100	Merino et al., 2003
--	--	-------	--------	---------------------

FONTE: O autor (2016).

Em algumas situações (Alt/fosfolipase A1; Act/AerA) dois fatores distintos associados com virulência apresentaram elevada identidade e cobertura com uma mesma sequência de *A. trota*, a que apresentou maior similaridade foi considerada.

Existem poucas informações sobre virulência em *A. trota*. Estudos anteriores descreveram a produção da toxina formadora de poros AerA, a hemolisina AHH1, as enterotoxinas citotônicas termo-lábil (Alt) e termo-estável (Ast) e uma serina-protease (KHAN, et al., 1998; ALBERT, et al., 2000; TAKAHASHI, et al., 2014). Dentre estas, foram identificadas no genoma de *A. trota* 1999LCR sequências codificadoras para AerA, Ast e serina protease (Tabela 10), sugerindo que sejam características comuns entre estirpes da espécie.

Outras características de virulência já descritas em outras espécies *Aeromonas* (SESHADRI, et al., 2006; GRIM, et al., 2013, 2014) estão sendo associadas agora com *A. trota*. Entre elas a presença de apêndices de superfície como pili Tap tipo IV, pili Msh tipo IV e os genes associados com a sua biossíntese e montagem (TABELA 10).

Genes que codificam para flagelos polar e lateral também foram identificados no genoma da estirpe *A. trota* 1999LCR. Pili e flagelos desempenham funções importantes no processo de adesão e colonização do hospedeiro (JANDA e ABBOTT, 2010). A presença de ambos os flagelos se correlaciona com os resultados que mostraram que a bactéria apresenta motilidade do tipo *swimming* e *swarming*.

Foram identificados vários genes em *A. trota* 1999LCR que codificam para proteínas associadas com efeitos tóxicos no hospedeiro incluindo hemolisinas (hemolisina cupin-like, hemolisina III, hemolisina termoestável) que causam lise celular; enzimas como hialuronidase, enolase e colagenase que contribuem para a penetração de barreiras, invasão e disseminação da bactéria no hospedeiro (JANDA e ABBOTT, 2010; TÓMAS, 2012). A presença de hemolisinas está em acordo com a atividade hemolítica causada por esta bactéria em eritrócitos humanos (WOLF, 2011).

Adicionalmente, a anotação pelo RAST indicou a presença de um gene que codifica um inibidor da lisozima de vertebrados (Ivy) que pode proteger a bactéria contra os efeitos líticos da enzima contribuindo para a colonização do hospedeiro (CALLEEWAERT, et al., 2012).

Também foram identificados genes que codificam um Sistema de Secreção Tipo 2 (SST2). O SST2 é um dos 5 tipos de sistema de secreção de proteínas encontrados em bactérias gram-negativas que permite a exportação de proteínas da

célula bacteriana para o meio extracelular. Está associado com a fisiologia bacteriana e também com a virulência de patógenos humanos, de animais e de plantas (CIANCIOTTO, 2005). É bastante conservado e foi descrito em todos os membros de *A. hydrophila* estudados. Participa da secreção de vários fatores de virulência incluindo aerolisina, proteases, e da enterotoxina Act (GRIM et al., 2014; RASMUSSEN-IVEY et al., 2016).

Finalmente, genes que codificam proteínas de um Sistema de Secreção Tipo 6 (SST6) foram encontrados no genoma de *A. trota* 1999LCR. O T6SS é codificado por 15 a 20 genes, que incluem proteínas secretadas e não secretadas, componentes do aparato de secreção (SUAREZ et al., 2008; 2010).

Os SST6 são codificados em *clusters* grandes e de composição gênica variável (BOYER et al., 2009; COULTHURST, 2013). Contém 13 genes essenciais conservados que codificam as proteínas que formam o aparelho de secreção que se projeta do citoplasma bacteriano, atravessa a membrana citoplasmática, periplasma e membrana externa e a célula alvo (BOYER et al., 2009). A secreção das proteínas efetoras ocorre em um passo, independentemente dos sistemas Sec e Tat.

Parece uma estrutura híbrida na qual parte é derivada de bacteriófagos e outros componentes são similares a proteínas associadas com diferentes sistemas de secreção (COULTHURST, 2013).

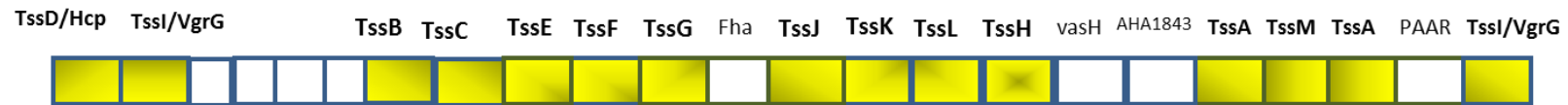
Há subclasses de SST6 que diferem quanto às proteínas regulatórias e acessórias (BOYER et al., 2009), e a nomenclatura é confusa uma vez que para cada organismo diferentes nomes tem sido adotados para cada gene/proteína (SUAREZ et al., 2008; BOYER et al., 2009; COULTHURST, 2013). No presente trabalho foi adotada a nomenclatura Tss (SHALOM et al., 2007; COULTHURST, 2013) para evitar essa dificuldade, e quando inevitável, a nomenclatura utilizada no RAST.

Além dos 13 genes essenciais os *clusters* de SST6 podem conter outros componentes conservados em vários desses sistemas como o componente estrutural Fha, proteínas regulatórias pós-tradicionais e ativadores transcricionais dependentes de sigma 54 como VasH. Outros genes compartilhados entre poucos ou nenhum outro SST6 também podem estar presentes (COULTHURST, 2013).

A figura 9 compara a estrutura dos *clusters* dos SST6 de *A. hydrophila* ATCC 7966 e *A. trota* 1999LCR.

FIGURA '18: DISTRIBUIÇÃO DOS GENES NO *CLUSTER* SST6 DE *A. hydrophila* ATCC 7966 E *A. trota* 1999LCR.

***A. hydrophila* ATCC 7966**



***A. trota* 1999LCR**



Contig 10



Contig 11



Legenda: Estrutura do *cluster* de *A. hydrophila* modificado de Suarez et al 2008. O *cluster* de *A. trota* foi feito de acordo com a anotação do RAST e usando quando possível nomenclatura Tss. Os retângulos preenchidos representam os 13 componentes essenciais do T6SS identificados com a nomenclatura Tss. Abaixo estão representadas duas outras regiões do genoma de *A. trota* descritas no RAST (not in subsystems) nos contigs 10 e 11 contendo genes do SST6. PH- proteína hipotética; UP- proteína uropatogênica específica; PT- provável transportador de ácido fenilpropionico; PM- suposta proteína de membrana; Reg* - regulador transcrricional sigma-54 dependente; RHS (Rhs element VgrG family) (TssI); Nomenclaturas comuns: Hcp (TssD); VgrG (TssI).

Fonte: Suarez et al 2008 modificado.

Os 13 componentes essenciais do SST6 são denominados TssA a TssM (COULTHURST, 2013).

A estrutura do *cluster* SST6 (Figura 9) sugere uma estrutura similar entre as duas bactérias. No entanto enquanto em *A. hydrophila* TssD e TssI encontram-se na extremidade do *cluster*, na mesma posição em *A. trota* a anotação do RAST indica a presença de uma proteína hipotética e TssI (nomenclatura adaptada) que se encontram na extremidade do contig. Os demais genes são colineares, e alguns genes acessórios como *fha* e *vasH* também estão indicados e nestes casos foi mantida a nomenclatura do RAST em *A. trota*. Outra diferença se observa em relação aos componentes descritos após TssM. Em *A. hydrophila* estão presentes genes que codificam para proteína com motivo PAAR e TssI, ao passo que na mesma posição em *A. trota* se encontram genes que codificam uma proteína hipotética e proteína uropatogênica situados na extremidade do contig e o último pode estar incompleto. O *cluster* SST6 está contido no *contig* 5 do genoma de *A. trota*, mas nos *contigs* 10 (*tssD/hcp* e duas cópias de *tssI/vgrG*) e 11 (*tssD/hcp* e *tssI/vgrG*) também foram encontrados genes essenciais que tanto podem codificar para proteínas estruturais do SST6 ou proteínas efetoras (SHA et al., 2013).

O T6SS é capaz de exportar proteínas efetoras para o meio extracelular ou é capaz de translocá-las diretamente para o citoplasma da célula hospedeira eucariótica, levando ao desenvolvimento de alterações na fisiologia da célula hospedeira (SUAREZ et al., 2008; COULTHURST, 2013). Foi mostrado, em *A. hydrophila*, que o SST6 está envolvido na inibição da fagocitose e na citotoxicidade (SUAREZ et al., 2008 e 2010). A translocação das proteínas efetoras VgrG-1 e Hcp foi associada com citotoxicidade. VgrG-1 de *A. dhakensis* SSU provoca a despolimerização da actina causando efeitos tóxicos na célula hospedeira e a translocação de Hcp provoca apoptose. Além disso a forma secretada de Hcp foi associada com a evasão do sistema imunológico inato através da inibição da fagocitose (GRIM, et al., 2014).

Portanto, diversos genes associados com virulência foram identificados no genoma da estirpe 1999LCR, vários deles podem estar relacionados às características fenotípicas observadas como motilidade *Swimming* e *Swarming* (flagelos polar e lateral); adesão em linhagens celulares humanas e efeitos citotóxicos (WOLF, 2011) incluindo pili, fímbrias, adesinas, hemolisinas, fosfolipases e SST6.

7 CONCLUSÕES

O desenvolvimento deste trabalho permitiu a caracterização molecular e fenotípica de *Aeromonas* isoladas no Paraná e Rio Grande do Sul e a adaptação de um protocolo de PFGE estabelecido pelo PulseNet para a tipagem destas bactérias, mostrando que as *Aeromonas* apresentam elevada diversidade genética, não tendo clone predominante entre as estirpes estudadas e que apenas 3 *clusters* foram identificados compostos respectivamente por estirpes de *A. caviae*, *A. veronii* sobria e *A. hydrophila*.

Houve elevada taxa de concordância na identificação das espécies de *Aeromonas* com base em métodos fenotípicos e sequenciamento de *gyrB*, sendo que as bactérias analisadas pertencem às espécies *A. caviae* (32), *A. hydrophila* (24), *A. veronii* bv sobria (22), *A. media* (4), *A. trota* (1) e *A. aquariorum* (1). Essa metodologia permitiu a identificação dos isolados previamente caracterizados apenas ao nível de gênero ou complexo.

Todas as estirpes apresentaram motilidade tipo *Swimming*, e a habilidade de *Swarming* foi observada em 57% delas. A maioria (70%) das estirpes foi capaz de formar biofilme em polipropileno.

O sequenciamento do genoma de *A. trota* 1999LCR, com aproximadamente 4,33 Mb com proporção de CG de 60%, contém 3877 regiões codificadoras, mostrou que essa bactéria é metabolicamente versátil e apresenta diversos genes de virulência, o que auxilia a esclarecer os mecanismos utilizados pelo microrganismo nos processos de colonização e infecção, etapas essenciais para o desenvolvimento futuro de estratégias anti-virulência para o combate de doenças.

8 REFERÊNCIAS

ABBOTT, S. L. *et al.* Misidentification of unusual *Aeromonas* species as members of the genus *Vibrio*: a continuing problem. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.4, p.1103-1104, 1998.

ABBOTT, S. L.; CHEUNG, W. K. W.; JANDA, J. M. The genus *Aeromonas*: Biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.6, p.2348-2357, 2003.

AL-BENWAN, K.; ABBOTT, S.; JANDA, J. M.; ALBERT, M. J. Cystitis caused by *Aeromonas caviae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 2348-2350, 2007.

ALBERT, M. J.; ANSARUZZAMAN, M.; TALUKDER, K. A.; CHOPRA, A. K.; KUHN, I.; RAHMAN, M.; FARUQUE, A. S.; ISLAM, M. S.; SACK, R.B.; MOLLBY, R. Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas spp.* Isolated from children with diarrhea, healthy controls and the environment. **Journal Clinical Microbiology**, v. 38, n. 10, p. 3785-3790, 2000.

ARAVENA-ROMAN, M.; CHANG, B.J.; RILEY, T.V.; INGLIS, T.J. Phenotypic characteristics of human clinical and environmental *Aeromonas* in Western Australia. **Pathology**, v.43, p.350-6, 2011.

ALCAIDE, E.; BLASCO, M. D.; ESTEVE, C. Mechanisms of quinolone resistance in *Aeromonas* species isolated from humans, water and eels. **Research in Microbiology**. v. 161, p. 40-5, 2010.

ALPERI, A.; FIGUERAS, M.J. Human Isolates of *Aeromonas* Possess Shiga Toxin Genes (stx1 and stx2) Highly Similar to the Most Virulent Gene Variants of *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Infect**, v.16, p.1563-7, 2010.

ALTSCHUL, S. F., MADDEN T. L., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; e LIPMAN D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389-3402, 1997.

ANGEL, M.F.; ZHANG, F.; JONES, M.; HENDERSON, J.; CHAPMAN, S.W. Necrotizing fasciitis of the upper extremity resulting from a water moccasin bite. **Southern Medical Journal**, v. 95, p. 1090-1094, 2002.

ASSIS, F. E. A.; WOLF, S.; SUREK, M.; De Toni, F.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; FARAH, S.M. S. S.; PICHETH, G. e FADEL-PICHETH, C.M.T. Impact of *Aeromonas* and diarrheagenic *Escherichia coli* screening in patients with diarrhea in Paraná, southern Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v.8, p.1609-1614, 2014.

AUCH, A.F.; VON JAN, M.; KLENK, H.P.; GÖKER, M. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. **Standards in Genomic Sciences**. p. 28, p.117-34, 2010.

AZIZ, R. K.; BARTELS, D.; BEST, A. A.; DEJONGH, M.; DISZ, T.; EDWARDS, R. A.; FORMSMA, K.; GERDES, S.; GLASS, E. M.; KUBAL, M.; MEYER, F.; OLSEN, G. J.; OLSON, R.; OSTERMAN, A. L.; OVERBEEK, R. A.; MCNEIL, L. K.; PAARMANN, D.; PACZIAN, T.; PARRELLO, B.; PUSCH, G. D.; REICH, C.; STEVENS, R.; VASSIEVA,

O.; VONSTEIN, V.; WILKE, A.; ZAGNITKO, O. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. **BMC Genomics**, 2008.

BANKEVICH, A.; NURK, S.; ANTIPOV, D.; GUREVICH, A.A.; DVORKIN, M.; KULIKOV, A.S.; LESIN, V.M.; NIKOLENKO, S.I.; PHAM, S.; PRJIBELSKI, A.D.; PYSHKIN, A. V.; SIROTKIN, A. V.; VYAHHI, N.; TESLER, G.; ALEKSEYEV, M.A.; PEVZNER, P.A. **Journal Computer Biology**, v.5, p.473-477, 2012.

BAMBINI, S. AND R. RAPPUOLI, The use of genomics in microbial vaccine development. **Drug Discovery Today**. v. 14, p. 252-60, 2009.

BARRET, T.J.; GERNER-SMIDT, P.; SWAMINATHAN, B. Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance. **Foodborne Pathogenic Diseases**, v.3, n.1, p.20-31, 2006.

BEATSON, S. A.; DE LUNA, M. G.; BACHMANN, N. L.; ALIKHAN, N.-F.; HANKS, K. R.; SULLIVAN, M. J.; WEE, B. A.; FREITAS-ALMEIDA, A. C.; DOS SANTOS, P. A.; DE MELO, J. T. B.; SQUIRE, D. J. P.; CUNNINGHAM, A. F.; FITZGERALD, J. R.; HENDERSON, I. R. Genome Sequence of the Emerging Pathogen *Aeromonas caviae*. **Journal of Bacteriology**. v. 193, n. 5, p. 1286–1287, 2011.

BEAZ-HIDALGO, R.; LATIF-EUGENÍN, F.; HOSSAIN, M.J.; BERG, K., NIEMI, R.M., RAPALA, J., LYRA, C.; LILES, M.R.; FIGUERAS, M.J. *Aeromonas aquatica* sp. nov., *Aeromonas finlandiensis* sp. nov. and *Aeromonas lacus* sp. nov. isolated from Finnish waters associated with cyanobacterial blooms. **Systematic and Applied Microbiology**, v.38, p.161-8, 2015.

BEAZ-HIDALGO, R.; MARTÍNEZ-MURCIA, A.; FIGUEIRAS, M.J. Reclassification of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* Huys et al. 2002 and *Aeromonas aquariorum* Martínez-Murcia et al. 2008 as *Aeromonas dhakensis* sp. nov. comb. nov. and emendation of the species *Aeromonas hydrophila*. **Systematic and Applied Microbiology**, v.36, p.171– 176, 2013.

BEAZ-HIDALGO, R.; ALPERI, A.; BUJÁN, N.; ROMALDE, J.L.; FIGUEIRAS, M.J. Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, p.149–153, 2010.

BIZZINI, A., DURUSSEL, C.; BILLE, J.; GREUB, G.; PROD'HOM, G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 48, p.1549-54, 2010.

BIZZINI, A.; GREUB, G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 16., p. 1614-1619, 2010.

BORCHARDT, M. A.; STEMPER, M. E.; STANDRIDGE, J. H. *Aeromonas* Isolates from Human Diarrheic Stool and Groundwater Compared y Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p., 224-228, 2003.

BORRELL, N.; ACINAS, S.G.; FIGUERAS, M.G.; MARTÍNEZ-MURCIA, A.J. Identification of *Aeromonas* Clinical Isolates by Restriction Fragment Length

Polymorphism of PCR-Amplified 16S rRNA Genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n. 7, p.1671-1674, 1997

BOYER,F.; FICHANT,G.; BERTHOD,J.; VANDENBROUCK, Y. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide *in silico* analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? **BMC Genomics**. v.10, p.1471-2164, 2009.

BRASCHLER, T.R.; MERINO, S.; JUAN M. TOMÁS, J.T.; GRAF, J. Complement resistance is essential for colonization of the digestive tract of *Hirudo medicinalis* by *Aeromonas* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 4268-4271, 2003.

BRENNER, D. J. ; Krieg, N.R.; Staley, J.T.; Garrity, G.M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v.2, parte B, p.556-578, Nova Iorque, EUA: Springer, 2005.

BÖHME, K.; FERNÁNDEZ-NO, I.C.; BARROS-VELÁZQUEZ, J.; GALLARDO, J.M.; CALO-MATA, P.; CAÑAS, B. Species Differentiation of Seafood Spoilage and Pathogenic Gram-Negative by MALDI-TOF Mass Fingerprinting. **Journal of Proteome Research**. V.9, p. 31-69-3183, 2010.

BUCHANAN, R.L. The 'New' pathogens: An update of selected examples. **Association of Food and Drug Officials**, v. 48, p. 142-155, 1984.

BUSH,K.; JACOBY, G.A. Updated Functional Classification of β -Lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**. V. 54, p.969–976, 2010.

CARNAHAN, A.M.; JOSEPH, S.W. *Aeromonas* update: new species and global distribution. **Experientia**, v.45, p.402-3, 1991.

CARVALHO, M. C. da C. G.; da SILVA, D. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 735-744, 2010.

CANALS, R. et al. Analysis of the lateral flagellar gene system of *Aeromonas hydrophila* AH-3. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 3, p. 852-62, 2006.

CHERKAOUI, A.; HIBBS, J.; EMONET, S.; TANGOMO, M.; GIRARD, M.; FRANCOIS, P. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. **Journal of Clinical Microbiology**. v.48, p.1169-75, 2010.

CHOPRA, A. K.; HOUSTON, C. W. Enterotoxins in *Aeromonas* associated gastroenteritis. **Microbes and infection**, v.1, n.13, p.1129-1137, 1999.

CIANCIOTTO, N. P. Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. **Trends Microbiology**. V.13, p. 581-8, 2005.

COBURN, B.; SEKIROV, I.; FINLAY, B. B. Type III Secretion Systems and Disease. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 20, n. 4, p. 535-549, 2007.

COLSTON, S.M.; FULLMER, M., BEKA, L., LAMY, B., GOGARTEN, J.P.; GRAF, J. Bioinformatic genome comparisons for taxonomic and phylogenetic assignments using *Aeromonas* as a test case. **MBio**, v. 5, n. 6, p. 2136-14, 2014.

COLWELL, R. R.; MACDONELL, M. R.; DELEY, J. Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae*. fam. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**. New York, v. 36, p. 473-477, 1986.

COULTHURST, S.J. The Type VI secretion system - a widespread and versatile cell targeting system. **Research of Microbiology**. V.164, p.640-54, 2013.

DARINI AL, MAGALHÃES VD, LEVY CL, BARTH AL, COSCINA AL. Phenotyping and genotyping methods applied to investigate the relatedness of Brazilian isolates of *Enterobacter cloacae*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.32, p.1077-81, 1999.

Den BUTTER, C. P.; MAHIEU, L. M. A neonate with a meningomyelocele complicated by *Aeromonas caviae* ventriculoperitoneal shunt infection. **Acta Clinica Belgica**, p.68-5, 2013.

DELCHER, A.L.; HARMON, D.; KASIF, S.; WHITE, O.; SALZBERG, S.L. Improved microbial gene identification with GLIMMER. **Nucleic Acids Research**. v.27, p.4636-4641, 1999.

DEKKER, P. J.; BRANDA, J.A. MALDI-TOF Mass spectrometry in the Clinical Microbiology Laboratory. **Clinical Microbiology Newsletter**. v.33, p.87-93, 2011. DEMIREV, P.A.; FENSELAU, C. Mass spectrometry in biodefense. **Journal of Mass Spectrometry**. v.43, p.1441–1457, 2008.

DICE, L. R. Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology**. v.26, p.297-302, 1945.

DOBRINDT, U.; HOCHHUT, B.; HENTSCHEL, U.; HACKER, J. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. **Nature Reviews Microbiology**. v.2, p.414-424, 2004.

DRLICA, K.; ZHAO, X. DNA Gyrase, Topoisomerase IV, and the 4-Quinolones. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.61, p. 377-392, 1997.

EVANGELISTA-BARRETO, N.S.; VIEIRA, R.H.S.F.; CARVALHO, F.C.T.; TORRES, R.C.O.; SANTÁNNA, E.S.; RODRIGUES, D.P.; REIS, C.M.F. *Aeromonas* spp. isolated from oysters (*Crassostrea Rhizophorea*) from a natural oyster bed, Ceará, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, n.3, p. 129-133, 2006.

EWING, W. H., R. HUGH, AND J. G. JOHNSON. Studies on the *Aeromonas* group. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA.1961.

FIGUERAS, M. J.; ALPERI, A.; SAAVEDRA, M. J.; KO, W. C.; GONZALO, N.; NAVARRO, M.; MARTÍNEZ-MURCIA, A. J. Clinical Relevance of the Recently Described Species *Aeromonas aquariorum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, p. 3742–3746, 2009.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J.; The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 623-633, 2010.

GALINDO, C. L. *et al.* Host immune responses to *Aeromonas* virulence factors. **Currente Immunology Reviews**, v. 2, p.13-26, 2006.

GAL-MOR, O.; BRETT FINLAY, B. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. **Cellular Microbiology**, v. 8, p.1707–1719, 2006.

GAVIN, R., RABAAN, A.A.; MERINO, S.; TOMÁS, J.M.; GRYLLOS, I.; SHAW, J. Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. **Molecular Microbiology**, v.43, n.2, p. 383-397, 2002.

GASTÓN, J. Epidemiology, etiology and pathophysiology of traveler's diarrhea. **Digestion**, v.73, p. 102-108, 2006.

GHENGHESH, K.S.; AHMED, S.F.; EL-KHALEK, R. A.; AL-GENDY, A.; KLENA, J. *Aeromonas*-Associated Infections in Developing Countries. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 2, p. 81-98, 2008.

GOLD, W.L., SALIT, I.E. *Aeromonas hydrophila* infections of skin and soft tissue: report of 11 cases and review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 16, p. 69-74, 1993.

GORIS, J.; KONSTANTINIDIS, K.T.; KLAPPENBACH, J.A.; COENYE, T.; VANDAMME, P.; TIEDJE, J. M. Dna-Dna hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Pt 1, p.81-91, 2007.

GRIM, C.J.; KOZLOVA, E.V.; PONNUSAMY, D.; FITTS, E.C.; SHA, J.; KIRTLEY, M.L.; VAN LIER, C.J.; TINER, B.L.; EROVA, T.E.; JOSEPH, S.J.; READ, T.D.; SHAK, J.R.; JOSEPH, S.W.; SINGLETARY, E.; FELLAND, T.; BAZE, W.B.; HORNEMAN, A.J.; CHOPRA, A.K. Functional genomic characterization of virulence factors from necrotizing fasciitis-causing strains of *Aeromonas hydrophila*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.80, n14, p.4162-4183, 2014.

GRIM, C. J.; KOZLOVA, E.V.; SHA, J.; FITTS, E.C.; VAN LIER, C.J.; KIRTLEY, M.L.; JOSEPH, S.J.; READ, T.D.; BURD, E.M.; TALL, B.D.; JOSEPH, S.W.; HORNEMAN, A.J.; CHOPRA, A. K.; SHAKC, J.R. Characterization of *Aeromonas hydrophila* Wound Pathotypes by Comparative Genomic and Functional Analyses of Virulence Genes. **mBio**, v.4, p1-13, 2013.

GUERRA, I.M.F.; FADANELLI, R.; FIGUEIRÓ, M.; SCHREINER, F.; DELAMARE, A.P.L.; WOLLHEIM, C.; COSTA, S.O.P. e ECHEVERRIGARAY, S. *Aeromonas* associated diarrhoeal disease in south Brazil: prevalence, virulence factores and antimicrobial resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 638-643, 2007.

GUZMAN, E.; ROMEU, A ; GARCIA-VALLVE, S. Completely sequenced genomes of pathogenic bacteria: a review. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.26, p. 88-98, 2008.

HACKER, J.; KAPER, J. B. Pathogenic islands and the evolution of microbes. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 641-679.

HACKER, J.; CARNIEL, E. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. **EMBO reports**, v. 2, p. 376–381, 2001.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P.; Evolving concepts in biofilm infections. **Cellular Microbiology**, v. 11, p 1034-1043, 2009.

HÄNNINEN, M.L.; HIRVELÄ-KOSKI, V. Genetic diversity of atypical *Aeromonas salmonicida* studied by pulsed-field gel electrophoresis. **Epidemiology & Infection**, v.123, p.299-307, 1999.

HOFFER, E.; REIS, C.M.F.; THEOPHILO, G.N.D.; CAVALCANTI, V.O.; LIMA, N.V.; MARIA DE HENRIQUES, M.F.C.M. Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarréica aguda em São Bento do Una, Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 217-220, 2006.

HOLMBERG, S.D. et al. *Aeromonas* intestinal infections in the United States. **Annals of Internal Medicine**, v. 105, p. 83–89, 1986.

HORNEMAN, A. J.; ALI, A.; ABBOTT, S. L. *Aeromonas*. In MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M.L.; PFALLER, M.A. **Manual of Clinical Microbiology**, American Society for Microbiology Press: Washington D.C., 9ed., v.1, p.716-721, 2007.

JANDA, J. M. Recent Advances in the Study of the Taxonomy, Pathogenicity, and Infectious Syndromes Associated with the Genus *Aeromonas*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, n. 4, p. 397-410, 1991.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v.23, n.1, p. 35–73, 2010.

JANDA, J. M. e ABBOTT, S. L. Revisiting Bacterial Gastroenteritis, Part I: Issues, Possible Approaches, and an Ever-Expanding List of Etiologic Agents. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 30, p. 71-76, 2011.

JAMNINES, G. e DE VOS, D. A Review of Current and Future Molecular Diagnostic Test for Use in the Microbiology Laboratory. In: O'CONNOR, L. **Methods in Molecular Biology - Diagnostic Bacteriology**. Totowa: Humana Press, V. 345, Ed. 2, p.1-21, 2006.

JORGE, M.T.; NISHIOKA, S. A; DE OLIVEIRÁ, R. B.; RIBEIRO, L.A.; SILVEIRA, P.V. *Aeromonas hydrophila* soft-tissue infection as a complication of snake bite: report of three cases. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 92, p. 213-217, 1998.

JOSEPH, S. W.; A.M. CARNAHAN, A.M. Update on the genus *Aeromonas*: despite progress, many questions about this pathogen remain unanswered. **ASM News**, v. 66, p. 218–223, 2000.

KEARNS, D. B. A field guide to bacterial *Swarming* motility. **Nature Review Microbiology**, v. 8, p 634-643, 2010.

KHAN, A. A.; KIM, E.; CERNIGLIA, C.E. Molecular Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression in *Escherichia coli* of a Hemolytic Toxin (*Aerolysin*) Gene from *Aeromonas trota*. **Applied and Environmental Microbiology**. p. 2473–2478, 1998.

KHARDORI, N.; FAIRSTEIN, V. *Aeromonas* and *Plesiomonas* as etiological agents. **Annu Review Microbiology**, v. 42, p. 395-419, 1988.

KHAJANCHI, B.K.; FADL, A.A.; BORCHARDT, M.; BERG, R.L.; AMY J. HORNEMAN, A.J.; STEMPER, M.E.; JOSEPH, S.W.; MOYER, N.P.; SHA, J. ; CHOPRA, A.K. Distribution of Virulence Factors and Molecular Fingerprinting of *Aeromonas* Species Isolates from Water and Clinical Samples: Suggestive Evidence of Water-to-Human Transmission. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p. 2313–2325, 2010.

KIROV, S.M.; CASTRISIOS, M.; SHAW, J.G. *Aeromonas* flagella (polar and lateral) are enterocyte adhesins that contribute to biofilm formation on surfaces. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 4, p.1939-1945, 2004.

KIROV, S.M. *Aeromonas* species. In: Foodborne Microorganisms of Public Health Significance. **Food Microbiology**. Ed.6, p.553–575, 2003.

KIROV, S. M.; TASSELL, B.C.; SEMMLER, A.B.; O'DONOVAN, L.A.; RABAAN, A.A.; SHAW, J.G. Lateral flagella and *Swarming* motility in *Aeromonas* species. **Journal of Bacteriology**, v.184, n. 2, p.547-555, 2002.

KÖRKÖCA, H.; BERKTAS, M.; DURMAZ, R.; GÜRSOY, N. C. The research of clonal relationship among *Aeromonas* strains isolated from human, animal and drinking water by PFGE. **The Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Kafkas**. v. 19, p. 271-276, 2013.

KONSTANTINIDIS, K. T.; TIEDJE, J.M. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. **PNAS**. v.102, p.2567–2572, 2005.

KOSER, C.U., ELLINGTON, M.J.; CARTWRIGHT, E.J.P.; GILLESPIE, S.H.; BROWN, N.M.; FARRINGTON, M.; HOLDEN, M.T.G.; DOUGAN, G.; BENTLEY, S.D.; PARKHILL, J.; PEACOCK, S.J. Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology. **PLoS Pathogens**, v.8, p. e1002824, 2012.

KUMAR, M. R.; VENKATESH, V. N.; SUDHINDRA, K. S. *Aeromonas* species isolated from a case of meningitis. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**. v.57, p.521-183, 2014.

KUNIMOTO, D.; RENNIE, R.; CITRON, D. M.; GOLDSTEIN, E.J.C. Bacteriology of a bear bite wound to a human: case report. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 3374-3376, 2004.

KÜPFER, M.; KUHNERT, P.; KORCZAK, B.M.; PEDUZZI, R.; DEMARTA, A. Genets relationships of *Aeromonas* strains inferred from 16S, *gyrB* and *rpoD* gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 56, p. 2743-2751, 2006.

KURTZ, S.; PHILLIPPY, A.; DELCHER, A.L.; SMOOT, M.; SHUMWAY, M.; ANTONESCU, C.; SALZBERG, S.L. Versatile and open software for comparing large genomes. **Genome Biology**. v.5, 2004.

LAI, C. C., C. C. SHIAO, G. D. LU, L. W. DING. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* bacteremia: rare pathogens of infection in a burn patient. **Burns**, v.33, p. 255–257, 2007.

LASLETT, D.; CANBACK, B. ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. **Nucleic Acids Research**. v.32, p 6-11, 2004.

LAY JR., J. O.; HOLLAND, R.D. Rapid Identification of Bacteria Based on Spectral Patterns Using MALDI-TOFMS. **Methods in Molecular Biology**, v. 146, 2001.

LI, Y.; LIU, Y.; ZHOU, Z.; HUANG, H.; REN, Y.; ZHANG, Y.; LI, G.; ZHOU, Z.; WANG, L. Complete Genome Sequence of *Aeromonas veronii* Strain B565. **Journal of Bacteriology**, v.193, p. 3389–3390, 2011.

LIU S.L., SCHRYRERS A.B., SANDERSON K.E., JOHNSTON R.N. Bacterial phylogenetic clusters revealed by genome structure. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p.6747-55. 1999.

LOWRY, R.; BABOA, S.; PARKER, J.; SHAW, J. *Aeromonas* flagella and colonization mechanisms. IN: POOLE, R. Advances in Bacterial Pathogen Biology. **Academic Press**, Ed 1, p. 204-214, 2014.

MARTIN-CARNAHAN, A.; JOSEPH, S.W. Genus I. *Aeromonas* Stanier 213, p. 557-578, 1943. Genus I. *Aeromonas* Stanier 1943, 213^{AL}. In **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd edn, vol. 2, part B, p. 557–578. New York: Springer.

MARTINS, L.M.; MARQUEZ, R.F.; YANO, T. Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food and human infection. **FEMS Pathogens and Diseases**, 2002.

MCMAHON, M.A.; WILSON, I.G. The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. **Internacional Journal of Food Microbiology**. v.22, p.155-62, 2001.

MENCACCI, A.; CENCI, E.; MAZZOLLA, R.; FARINELLI, S.; D'ALÒ, F.; VITALI, M.; ISTONI, F. *Aeromonas veronii* biovar *veronii* septicaemia and acute suppurative cholangitis in a patient with hepatites B. **Journal of Medical Microbiology**. v.8, p.727-730, 2003.

MERINO, S.; TOMAS, J. M.; “Lateral flagella systems,” in *Pili and Flagella: Current Research and Future Trends*, Caister Academic Press, Norfolk, UK, , pp. 173– 190, 2009.

MERINO, S.; SHAW, J. G.; TOMAS, J. M.; Bacterial lateral flagella: an inducible flagella system. **Federation of European Microbiological Societies Letter**, v. 263, p.127-135. 2006

MERINO, S.; AGUILAR, A.; NOGUERAS, M. M.; REGUE, M.; SWIFT, S.; TOMÁS, J. M. Cloning, Sequencing, and Role in Virulence of Two Phospholipases (A1 and C) from Mesophilic *Aeromonas* sp. Serogroup O:34. **Infection and Immunity**, v.67, n.8, p. 4008–4013, 1999.

MERINO, S.; RUBIRES, X.; KNOCHER, S.; TOMÁS, J.M.; Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. **International Journal of Food Microbiology**, v.28, p.103-113, 1995.

METZKER, M.L., Sequencing technologies - the next generation. **Nature Reviews Genetics**, v.11, p. 31-46, 2010.

MEIER-KOLTHOFF, J.P.; AUCH A.F.; KLENK, H.P.; GÖKER, M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. **BMC Bioinformatics**. v.21, p.14-60, 2013.

MEYER, B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 51, p.249-253, 2003.

MICHEL, G. P. & VOULHOUX, R. (2009). The type II secretory system (T2SS) in Gram negative bacteria: a molecular nanomachine for secretion of Sec and Tat-dependent extracellular proteins. **Microbiology**, v. 157, p1945–1954, 2011.

MORANDI, A.; ZHAXYBAYEVA, O.; GOGARTEN, J.P.; GRAF, J. Evolutionary and diagnostic implications of intragenomic heterogeneity in the 16S rRNA gene in *Aeromonas* strains. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 6561-6564, 2005.

MORIEL, B.; CRUZ, L. M.; DALLAGASSA, C. B.; FAORO, H.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; REGO, F. G. M.; PICHETH, G.; FADEL-PICHETH, C. M. T.; Draft genome sequence of *Aeromonas caviae* 8LM isolated from child with diarrhea in South of Brazil. **Genome Announcements**, v. 3, n. 3, p.e00524-15, 2015.

MONAGHAN, S.F. ANJARIA, D.; MOHR, A.; LIVINGSTON, D. H. Necrotizing Fasciitis and Sepsis Caused by *Aeromonas hydrophila* after Crush Injury of the Lower Extremity. **Surgical Infections**, v. 9, p. 459-467, 2008.

MOYER, N.P.; LAREW, M.S. Recurrent gastroenteritis caused by *Aeromonas* species: A case history. **Journal of diarrhoeal diseases research**, v. 8, p. 144, 1988.

NEYTS, K.; HUYS, G.; UYTENDAELE, M.; SWINGS, J.; DEBEVERE, J. Incidence and identification of mesophilic *Aeromonas* spp. from retail foods. **Letters in Applied Microbiology**. v.31, p. 359-363, 2000.

NOJIMOTO, I.T.I.; BEZANA, C.S.C.; CARMO, C.; VALADÃO, L.M.; CARRIJO, K.M. Prevalência de *Aeromonas* spp. em fezes diarréicas de crianças menores de 5 anos de idade na cidade de Goiânia, Goiás, no biênio 1995-1996. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, p. 385-388, 1997.

O'HLCI, B.; OLIVIER, G.; POWELL, R.. Genetic diversity of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* demonstrated by random amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis analyses. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 39, p. 109-119, 2000.

OLSVIK, Ø.; STROCKBINE, N.A. PCR Detection of Heat-Stable, Heat-Labile, and Shiga-Like Toxin Genes in *Escherichia coli*. In: PERSING, D.H.; SMITH, T.F.; TENOVER, F.C.; WHITE, T.J. **Diagnostic Molecular Microbiology**, Washington: ASM, p. 271-276, 1993.

OPLUSTIL, C. P.; ZOCCOLI, C.; TOBOUTI, N. R., SINTO, S. I. M. Procedimentos Básicos Em Microbiologia Clínica. Elsevier, São Paulo. Ed.3, p.960, 2010.

OVERBEEK, R.; OLSON, R.; PUSCH, G.D.; OLSEN, G.J.; DAVIS, J.J.; DISZ, T.; EDWARDS, R.A.; GERDES, S.; PARRELLO, B.; SHUKLA, M.; VONSTEIN, V.; WATTAM, A.R.; XIA, F. e STEVENS, R. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). **Nucleic Acids Research**. v.42, D206-214, 2014.

PABLOS, M.; RODRÍGUEZ-CALLEJA, J.M.; SANTOS, J. A.; OTERO, A.; GARCÍA-LÓPEZ, M.L. Occurrence of motile *Aeromonas* in municipal drinking water and distribution of genes encoding virulence factors. **International Journal of Food Microbiology**, v.135, p.158–164, 2009.

PAMPÍN, F.; BOU, G.; GALEIRAS, R.; FREIRE, D.; BOUZA, M.T.; ZÚÑIGA, M.C. *Aeromonas* y meningitis: una presentación infrecuente. **Neurocirurgia**, v. 23, p. 200-202, 2012.

PARKER, J.L.; SHAW J.G.. *Aeromonas* spp. Clinical Microbiology and Disease. **Journal of Infection**, v. 62, n. 2, p.109-118. 2010.

PARKINSON, N.; COWIE, C.; HEENEY, J.; STEAD, D. Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 264 – 274, 2009

PARTRIDGE, J.D.; HARSHEY, R.M. Swarming: flexible roaming plans. **Journal of Bacteriology**. V.195, p. 909-18, 2013.

PEMBERTON, J.M.; KIDD, S.P.; SCHMIDT, R. Secreted enzymes of *Aeromonas*. **FEMS Microbiol Lett**. v.152, p.1-10, 1997.

PERCIVAL, S. *et al. Aeromonas*. **Microbiology of waterborne diseases**. Ed: Elsevier Academic Press, Londres, UK, p.30-41, 2004.

PEREIRA,C.S.; AMORIM,S.D.;SANTOS, A.F.M., REIS,C.M.F., THEOPHILO, G.N.D.; RODRIGUES, D.P. Characterization of *Aeromonas* spp isolates from newborns hospitalized. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.41, p.179-182, 2008.

PERSING, D.H; TENOVER, F.C.; VERSALOVICK, J.; TANG, Y.; UNGER, E.R.; RELMAN, D.A.; WHITE, T.J. Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice. **ASM Pres**, Washinton DC, p.185-195, 2004.

PNL05, C. Standard operating procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. **PNL05 Last Updated April 2013**, 2013. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-Shigella-Salmonella-pfge-protocol-508c.pdf> >. Acesso em: 10 Dec 2015.

PREDIGER, K.C. Utilização de fontes de carbono por estirpes de *Aeromonas* spp. e *draft* genoma de *A. veronii* bv sobria 312 M. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná – Curitiba, 2015.

POULSEN V.L. Microbial biofilm in food processing. **Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie**, 32: 321–326, 1999.

PUTHUCHEARY S. D., PUAH S. M., CHUA K. H. 2012. Molecular characterization of clinical isolates of *Aeromonas* species from Malaysia. **PLoS ONE**. v.7, p. 1-7, 2013.

RASMUSSEN-IVEY, C.R.; FIGUERAS, M.J.; MCGAREY, D.; LILES, M.R. Virulence Factors of *Aeromonas hydrophila*: In the Wake of Reclassification. **Frontiers in Microbiology**, v.7, p.1-10, 2016.

REBOLI, A.C.; HOUSTON, E.D.; MONTEFORTE, J.S.; WOOD, C.A.; HAMILL, R.J. Discrimination of epidemic and sporadic isolates of *Acinetobacter baumannii* by repetitive element PCR-mediated DNA fingerprinting. **Clinical Microbiology**, v. 32, n. 11, 1994.

REINA, J.; LOPEZ, A. Gastroenteritis caused by *Aeromonas trota* in a child. **Journal Clinical Pathology**. v. 49, n. 2, p.173-175, 1996.

REITH, M.E.; SINGH, R.K.; CURTIS, B.; BOYD, J.M.; BOUEVITCH, A.; KIMBALL, J.; MUNHOLLAND, J.; MURPHY, C.; SARTY, D.; WILLIAMS, J.; NASH, J.H.E.; JOHNSON, S.C.; BROWN, L.L. The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. **BMC Genomics**, v.9, p.1-15, 2008.

RONAGHI, M., M.; UHLÉN, P.; NYRÉN, A. Sequencing Method Based on Real-Time Pyrophosphate. **Science**, v. 281, p. 363-365, 1998.

RONDELET, A.; CONDEMIN, G. Type II secretion: the substrates that won't go away. **Research in Microbiology**. v.164, p.164:556–561, 2013.

RUTHERFORD, K.; PARKHILL, J.; CROOK, J.; HORSNELL, T.; RICE, P.; RAJANDREM, M.A. e BARRELL, B. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics**, v. 16, n. 10, p. 944-945, 2000.

SAAVEDRA, M.J.; FIGUERAS, M.J. e MARTÍNEZ-MURCIA, A.J. Updated phylogeny of the genus *Aeromonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p. 2481-2487, 2006.

SALUNKE, G.; NAMSHIKAR, V.; GAONKAR, R.; GAONKAR, T. A case of *Aeromonas hydrophila* meningitis in septic shock. **Tropical Journal of Medical Research**, v.18, Issue 1, p54-57, 2015.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning – A Laboratory Manual**. 2 ed. New York: CSH, 1989.

SANTOS, P. G. et al. Association of *Aeromonas caviae* polar and lateral flagella with biofilm formation. **Letter Applied Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 49-55, 2011.

SAUER, S.; FREIWALD, A.; MAIER, T.; KUBE, M.; REINHARDT, R.; KOSTRZEWA, M.; GEIDER, K. Classification and Identification of Bacteria by Mass Spectrometry and Computational Analysis. **PLoS ONE**. v. 3, p.1-10, 2008.

SESHADRI, R.; JOSEPH, S.W.; CHOPRA, A.K.; SHA, J.; SHAW, J.; GRAF, J.; HAFT, D.; WU, M.; REN, Q.; ROSOVITZ, M. J.; MADUPU, R.; TALLON, L.; KIM, M.; JIN, S.; VUONG, H.; COLIN STINE, O.; ALI, A.; HORNE MAN, A.J.; HEIDELBERG, J.F. Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack of all trades. **Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 8272-82, 2006.

SHA, J.; ROSENZWEIG, J.A.; KOZLOVA, E.V.; WANG, S.; EROVA, T.E.; KIRTLEY, M.L.; VAN LIER, C.J.; CHOPRA, A.K. Evaluation of the roles played by Hcp and VgrG type 6 secretion system effectors in *Aeromonas hydrophila* SSU pathogenesis. **Microbiology**, v.159, p.1120-35, 2013.

SHAKIR, Z.; KHAN, S.; SUNG, K.; KHARE, S.; KHAN, S.; STEELE, R.; NAWAZ, M. Molecular Characterization of Fluoroquinolone-Resistant *Aeromonas* spp. Isolated from Imported Shrimp. **Applied Environmental Microbiology**, v.78, p. 8137-8141, 2012.

SINGH, D.V., SANYAL, S.C. Enterotoxigenicity of clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. **Journal Medical Microbiology**, v.36, p.269-272, 1992.

SINHA, S.; SHIMADA, T.; RAMAMURTHY, T.; BHATTARCHARYA, S.K.; YAMASAKI, S.; TAKEDA, Y.; NAIR, G.B. Prevalence, serotype distribution, antibiotic susceptibility and genetic profiles of mesophilic *Aeromonas* species isolated from hospitalized diarrhoeal cases in Kolkata, India. **Journal Medical Microbiology**, v. 53, p. 527-534, 2004.

SOLER, L.; YÁÑEZ, M. A.; CHACÓN, M.R.; AGUILERA ARREOLA, M.G.; CATALÁN, V.; FIGUERAS, M.J.; MARTÍNEZ-MURCIA, A. J. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1511–1519, 2004.

SOLER, L.; F. MARCO, F.; VILA, J.; CHACÓN, M. R.; GUARRO, J.; M. J. FIGUERAS, M.J. Evaluation of two miniaturized systems, MicroScan W/A and BBL Crystal E/NF, for identification of clinical isolates of *Aeromonas* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 5732-5734, 2003.

SCOARIS, D.D.E. O.; COLACITE, J.; NAKAMURA, C.V.; UEDA-NAKAMURA, T., DE ABREU FILHO, B.A.; DIAS FILHO, B.P. Virulence and antibiotic susceptibility of *Aeromonas* spp. isolated from drinking water. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.93, p.111-22, 2008.

STOODLEY, L.H.; COSTERTON, W.J.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Review Microbiology**, v.2, p.95-108, 2004.

SUAREZ, G.; SIERRA, J.C.; SHA, J.; WANG, S.; EROVA, T.E.; FADL, A.A.; FOLTZ, S.M.; HORNE MAN, A.J. e CHOPRA, A.A. Molecular Characterization of a Functional Type VI Secretion System from a Clinical Isolate of *Aeromonas hydrophila*. **Microbial Pathogenesis**, v.44, n.4, p.344-361, 2008.

SUAREZ, G.; SIERRA, J.C.; EROVA, T.E.; SHA, J.; HORNE MAN, A.J. e CHOPRA, A.K. A Type VI Secretion System Effector Protein, VgrG1, from *Aeromonas hydrophila* That Induces Host Cell Toxicity by ADP Ribosylation of Actin. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 1, p. 155–168, 2010.

SUREK, M., VIZZOTTO, B. S., SOUZA, E.M., PEDROSA, F.O., DALLAGASSA, C. B., FARAH, S. M. S. S., FADEL-PICHETH, C. M. T., Identification and Antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. Isolated from stool samples of Brazilian subjects with diarrhea and healthy controls. **Journal of Medical Microbiology**, v.59, p. 373-374, 2010.

SCHUBERT, R.H.W.; HEGAZI, M.; WAHLING, W. *Aeromonas enteropelogenes* species nova. **Hygiene Medzin**, v.15, p.471-472, 1990.

TAKAHASHI, E.; OZAKI, H.; FUJII, Y.; KOBAYASHI, H.; YAMANAKA, H.; ARIMOTO, S.; NEGISHI, T.; OKAMOTO, K.. Properties of hemolysin and protease produced by *Aeromonas trota*. **PLoS ONE**.v.9, 2014.

TENA, D.; GONZÁLEZ-PRAETORIUS, A.; GIMENO, C.; PEREZ-POMATA, M. T.; BISQUERT, J..Infección Extraintestinal por *Aeromonas* spp.: Revision de 38 Casos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.25, p. 235-241, 2007.

TENOVER FC, ARBEIT RD, GOERING RV, MICKELSEN PA, MURRAY BE, PERSING DH, SWAMINATHAN B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 2233-9, 1995.

TÓMAS, J.M. The Main *Aeromonas* Pathogenic Factors. **ISRN Microbiology**, v.2012, p.1-22, 2012.

TORRE, I.; FLORENZANO, G.; VILLARI, P.; PAVIA, M. Intestinal colonization by *Aeromonas* spp. in neonatal intensive care units. **Igiene Moderna**, v. 106, p. 147-155, 1996.

VALLY, H.; WHITTLE, A.; CAMERON, S.; DOWSE, G. K.; WATSON, T. Outbreak of *Aeromonas hydrophila* wound infections associated with mud football. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 1084-1089, 2004.

VILA, J.; RUIZ, J.; GALLARDO, F.; VARGAS, M.; SOLER, L.; FIGUERAS, M.J.; GASCON, J. *Aeromonas* spp. and traveler's diarrhea: clinical features and antimicrobial resistance. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n.5, p.552-555, 2003.

VILLARI, P.; CRISPINO, M.; MONTUORI, P.; BOCCIA S. Molecular Typing of *Aeromonas* Isolates in Natural Mineral Waters. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.697-701, 2003.

VIZZOTTO, B.V. Caracterização fenotípica e molecular de estirpes de *Aeromonas* isoladas no Paraná no período de 1999-2009. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná – Curitiba, 2009.

YAMAMOTO, S.; BOUVET, P. J. M.; HARAYAMA, S. Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA–DNA hybridization. **Internacional Journal of Systematic Bacteriology**. v. 49, p87–95, 1999.

YÃNES, M.A.; CATALÁN, V.; APRÁIZ, D.; FIGUERAS, M.J.; MARTÍNEZ-MURCIA, A.J. Pylogenectic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene

sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53; p. 875-883, 2003.

WATTIAU,P.; BOLAND, C.; BERTRAND,S. Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* subtyping: gold standarts and alternatives. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.7877-85, 2011.

WATANABE, K.; NELSON,J.; HARAYAMA,S.; KASAI, H . ICB database: the *gyrB* database for identification and classification of bacteria. **Nucleic Acids Research**. v. 29, p. 344–345, 2001.

WEI, W; GAO, F.; DU, M. Z.; HUA, H. L.; WANG, J.; GUO, F. B. Zisland Explorer: Detect genomic islands by combining homogeneity and heterogeneity properties. **Briefings in Bioinformatics**. 2016.

WEILE, J.; KNABBE, C .Current applications and future trends of molecular diagnostics in clinical bacteriology. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.394, p.731–742, 2009.

WOLF, S. Características de virulência em estirpes de *Aeromonas* spp. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná – Curitiba, 2012.

WONG, C.Y.F.; HEUZENROEDER, M.W.; FLOWER, R.L.P. Inactivation of two haemolytic toxin genes in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model. **Microbiology**, v.144, p.291-298, 1998

WU, C.J.; WANG·H.C.; CHEN, C.S.; SHU , H.Y.; KAO, A.W.; PO-LIN CHEN ; P.L; WEN-CHIEN KO , W.C. Genome Sequence of a Novel Human Pathogen, *Aeromonas aquariorum*. **Journal of Bacteriology**, v.194, p. 4114-5.2012.